



TESIS DOCTORAL

Uso de fármacos, con mecanismo de acción sobre la pared bacteriana, como adyuvante al tratamiento antimicrobiano para las infecciones causadas por bacilos Gram-negativos multirresistentes

Rafael Ayerbe Algaba

Sevilla 2019

Director 1: Jerónimo Pachón Díaz

Director 2: Younes Smani

Programa de Doctorado de Biología Molecular, Biomedicina e Investigación Clínica

Departamento de Medicina

Universidad de Sevilla



Departamento de Medicina

El Dr. Jerónimo Pachón Díaz, Profesor Emérito de Medicina de la Universidad de Sevilla, como Director y Tutor de la Tesis Doctoral, y el Dr. Younes Smani, investigador del programa Miguel Servet del Instituto de Salud Carlos III, como Director de la Tesis Doctoral,

CERTIFICAN:

Que la Tesis para optar al grado de Doctor por la Universidad de Sevilla que lleva por título **“Uso de fármacos, con mecanismo de acción sobre la pared bacteriana, como adyuvante al tratamiento antimicrobiano para las infecciones causadas por bacilos Gram-negativos multirresistentes”** ha sido realizada por el Licenciado Don Rafael Ayerbe Algaba bajo nuestra supervisión, considerando que reúne los requisitos necesarios para su presentación.

Para que conste a los efectos oportunos, expiden la presente certificación en Sevilla, a 08 de julio de 2019.

Jerónimo Pachón Díaz
Director y Tutor

Younes Smani
Director

AGRADECIMIENTOS

El mundo de los significados es un universo en el que uno puede jugar a ser tan subjetivo como la objetividad de los colores o los sabores. Cuando la palabra ‘agradecer’ se construye en los pasos que unen la línea de un largo viaje, debe ser algo más que un sentimiento con el que mostrar gratitud. Y en ese valle tan frondoso, prefiero obviar el personalismo para saborear y exprimir el jugo de los que hoy saben y se sienten partícipe del afecto del que nacen estas palabras. Así es como me siento más cerca de la libertad en la que siempre he deambulado durante esta larga y gratificante travesía. Es evidente que en todo objetivo, ya sea personal o profesional, existe un liderazgo que guía y aconseja. Mi reconocimiento hacia quien han sido sinónimo de una vida completa y plena de esfuerzo. La dedicación del que camina convencido es tan admirable como incuestionable. Es de buen aventurero reconocer también a ese compañero de viaje que conduce tan cerca de ti, que traza un trayecto con el mirar de la experiencia y te traslada a la parada más cercana al objetivo. Debo agradecer que el motor nunca se haya detenido, y la sinceridad como gasolina ha sido tan vital como innegociable.

No me olvido del comienzo, cuando lo desconocido es tan abrumador que simplemente el tiempo hace de juez para abrir la tapadera de la timidez. Pronto comprendí que llenar de humor la habitación de los que te rodean es sinónimo de cuidar el recurso humano. Las pequeñas grietas de un día gris nunca terminaron de resquebrajar los cimientos de un valor añadido en esta aventura. Y aquí es donde aparece la palabra amistad como la fuerza capaz de coger de la mano al compañerismo. Las horas finales de días en los que el atardecer avisaba de que no esperaríamos no eran obstáculo para que una buena conversación inundara las poyatas del laboratorio. Viajeros tan distintos en las formas de ser que se dejaron abrazar en el desafiante hecho de compartir destino final. Un libro abierto lleno de matices. Miedos e inseguridades a partes iguales, pero siempre con una risa que amenazaba con romper todos los demás temores. El respeto nos ha hecho tan fuertes como la voluntaria capacidad para haber construido esta amistad de la que hoy me siento profundamente agradecido. Estos años de viaje me han enseñado, además de lo mucho como profesional, a encontrarme y a conocer lo interior de aquellas personas que en su humildad me brindaron la oportunidad de ser mejor persona. Todo florece cuando la Raíz construye fundamentos para que esta experiencia haya sido una canción espectacular y, probablemente, irrepetible.

FINANCIACIÓN TESIS DOCTORAL

Ministerio de Economía y Competitividad, Instituto de Salud Carlos III. Proyecto de Investigación en Salud PI15/01358. “Eficacia terapéutica de MV5 y sus derivados como terapia combinada con colistina en un modelo experimental murino de infección grave por bacilos Gram-negativos”.

Ministerio de Economía y Competitividad, Instituto de Salud Carlos III. Proyecto de Investigación en Salud PI16/01378. “Eficacia terapéutica de la oxiclozanida como terapia combinada con colistina in vitro y en modelos experimentales murinos de infecciones graves”.

PRODUCCIÓN CIENTÍFICA RELACIONADA CON LA TESIS DOCTORAL

Publicaciones

1. Vila-Farrés X, Parra-Millán R, Sánchez-Encinales V, Varese M, **Ayerbe-Algaba R**, Bayó N, Guardiola S, Pachón-Ibáñez ME, Kotev M, García J, Teixidó M, Vila J, Pachón J, Giralt E, Smani Y. Combating virulence of Gram-negative bacilli by OmpA inhibition. *Scientific Reports* 2017;7:14683.
2. Parra-Millán R, Vila-Farrés X, **Ayerbe-Algaba R**, Varese M, Sánchez-Encinales V, Bayó N, Pachón-Ibáñez ME, Teixidó M, Vila J, Pachón J, Giralt E, Smani Y. Synergistic activity of an OmpA inhibitor and colistin against colistin-resistant *Acinetobacter baumannii*: mechanistic analysis and in vivo efficacy. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2018;73:3405-12.
3. **Ayerbe-Algaba R**, Gil-Marqués ML, Jiménez-Mejías ME, Sánchez-Encinales V, Parra-Millán R, Pachón-Ibáñez ME, Pachón J, Smani Y. Synergistic activity of niclosamide in combination with colistin against colistin-susceptible and colistin-resistant *Acinetobacter baumannii* and *Klebsiella pneumoniae*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 2018;8:348.
4. Miró-Canturri A*, **Ayerbe-Algaba R***, Smani Y. Drug repurposing for the treatment of bacterial and fungal infections. *Frontiers in Microbiology* 2019;10:41.

* Los autores han contribuido de igual manera.

5. **Ayerbe-Algaba R**, Gil-Marqués ML, Miró-Canturri A, Parra-Millán R, Pachón-Ibáñez ME, Jiménez-Mejías ME, Pachón J, Smani Y. The anthelmintic oxyclozanide restores the colistin activity in colistin-resistant Gram-negative bacilli. *International Journal of Antimicrobial Agents* 2019 Jul 9. pii: S0924-8579(19)30186-4. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2019.07.006. [Epub ahead of print].

Comunicaciones en congresos

1. **Ayerbe-Algaba R**, Sánchez-Encinales V, Parra-Millán R, Pachón-Ibáñez ME, Sánchez-Céspedes J, Pachón J, Smani Y. In vitro activity of niclosamide in combination with colistin against colistin-susceptible and colistin-resistant Gram negative bacilli. 26th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID). Ámsterdam, Holanda, 2016.

2. **Ayerbe-Algaba R**, Bayó N, Parra-Millán R, Seco J, Pachón-Ibáñez ME, Teixidó M, Pachón J, Giralt E, Smani Y. AOA-2 derivatives as outer membrane protein A inhibitors for treatment of Gram-negative bacilli infections. 11th International Symposium on the Biology of *Acinetobacter*. Sevilla, España, 2017.

3. Miró-Canturri A, **Ayerbe-Algaba R**, Parra-Millan R, Pachón-Ibáñez ME, Pachón J, Smani Y. In vitro activity of oxyclozanide in combination with colistin against colistin-susceptible and colistin-resistant gram-negative bacilli (GNB). 27th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID). A Viena, Austria, 2017.

Otras publicaciones relacionadas con la línea de investigación

1. Parra Millán R, Jiménez Mejías ME, Sánchez Encinales V, **Ayerbe Algaba R**, Gutiérrez Valencia A, Pachón Ibáñez ME, Díaz C, Pérez Del Palacio J, López Cortés LF, Pachón J, Smani Y. Efficacy of lysophosphatidylcholine in combination with antimicrobial agents against *Acinetobacter baumannii* in experimental murine peritoneal sepsis and pneumonia models. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2016;60:4464-70.

2. Parra-Millán R, Guerrero-Gómez D, **Ayerbe-Algaba R**, Pachón-Ibáñez ME, Miranda-Vizuet A, Pachón J, Smani Y. Intracellular Trafficking and Persistence of *Acinetobacter baumannii* Requires Transcription Factor EB. mSphere 2018;3 pii: e00106-18.

3. **Ayerbe Algaba R**, Álvarez-Marín R, Praena J, Smani Y. *Escherichia coli* causing meningitis in an adult: A case report and experimental characterization of its virulence. Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica 2019;37:418-9.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

ABREVIACIONES	3
FIGURAS Y TABLAS	4
RESUMEN	5
I. INTRODUCCIÓN	8
1. Antibióticos y resistencia antimicrobiana: situación actual	9
2. Infecciones asociadas a la atención sanitaria (IAAs)	13
3. Bacilos gramnegativos (BGN): epidemiología, resistencia antimicrobiana, virulencia y tratamiento	14
3.1. <i>Acinetobacter baumannii</i>	15
3.1.1. Epidemiología	15
3.1.2. Resistencia antimicrobiana	16
3.2. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	18
3.2.1. Epidemiología	18
3.2.2. Resistencia antimicrobiana	19
3.3. <i>Enterobacteriales</i>	20
3.3.1. Epidemiología	20
3.3.2. Resistencia antimicrobiana	21
3.4. Mecanismos de virulencia de BGN	22
3.4.1. Proteínas de membrana externa	22
3.4.2. Adherencia bacteriana y formación de <i>biofilm</i>	25
3.4.3. Motilidad	26
3.4.4. Lipopolisacárido	27
3.4.5. Vesículas de membrana externa	27
3.4.6. Sideróforos	28
3.4.7. <i>Quorum sensing</i>	28
3.5 Opciones de tratamiento actuales	30
3.5.1. Colistina	30
3.5.2. Ceftolozano/tazobactam	31
3.5.3. Ceftazidima/avibactam	32
4. Nuevas terapias para tratar las infecciones por BGN	33
4.1 Compuestos o inhibidores anti-virulencia	33
4.1.1. Inhibidores de <i>quorum sensing</i>	34
4.1.2. Inhibidores de la adhesión bacteriana	34

ÍNDICE DE CONTENIDOS

4.1.3. Inhibidores de los sistemas de secreción	35
4.1.4. Terapia de fagos	35
4.2. Moléculas con acción sobre el sistema inmune	36
4.2.1 Lisofosfatidilcolina	36
4.2.3 Péptidos antimicrobianos	37
4.3. “Repurposing”: reposicionamiento de fármacos	37
4.3.1 Los antihelmínticos	38
4.3.2 Los anticancerígenos	38
4.3.3 Los antiinflamatorios e inmunomoduladores	39
4.3.4 Los antipsicóticos y antidepresivos	39
4.3.5 Otros fármacos	40
II. FUNDAMENTOS	42
III. HIPÓTESIS	44
IV. OBJETIVOS	46
V. RESULTADOS	48
1. Capítulo I. Estudio del mecanismo de inhibición de OmpA por el AOA-2 y optimización de sus derivados en el impacto sobre la virulencia de los bacilos Gram-negativos.	49
1.1. Artículo 1. <i>Combating virulence of Gram-negative bacilli by OmpA inhibition.</i>	50
1.2. Artículo 2. <i>AOA-2 derivatives as outer membrane protein A inhibitors for treatment of Gram-negative bacilli infections.</i>	81
2. Capítulo II. Efecto de los antihelmínticos sobre la eficacia de la colistina frente a bacilos Gram-negativos.	107
2.1. Artículo 3. <i>Synergistic activity of niclosamide in combination with colistin against colistin-susceptible and colistin-resistant Acinetobacter baumannii and Klebsiella pneumoniae.</i>	108
2.2. Artículo 4. <i>Repurposing oxyclozanide potentiates activity of colistin against colistin-susceptible and colistin-resistant Acinetobacter baumannii, Pseudomonas aeruginosa and Klebsiella pneumoniae.</i>	118
VI. DISCUSIÓN GENERAL	145
VII. CONCLUSIONES	155
VIII. BIBLIOGRAFÍA	157

ABREVIACIONES

apoE: Apolipoproteína E

BGN: Bacilos gramnegativos

BLEE: β -lactamasas de espectro extendido

CDC: Centro para el Control y la Prevención de Enfermedades de Estados Unidos

DDD: Dosis diarias definidas

EARS-Net: Red Europea de Vigilancia de Resistencia Antimicrobiana

ECDC: Centro Europeo para la Prevención y Control de Enfermedades

EPC: *Enterobacteriales* productoras de carbapenemasas

FDA: Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos

IAA: Infecciones asociadas a la atención sanitaria

LPS: Lipopolisacáridos

NAVM: Neumonía asociada a ventilación mecánica

OmpA: Proteína de membrana externa A

PIRASOA: Programa integral de prevención y control de las infecciones relacionadas con la asistencia sanitaria y uso apropiado de los antimicrobianos

QS: Quorum sensing

SARM: *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina

SENIC: Estudio para la Eficacia del Control de la Infección Nosocomial

UCI: Unidad de cuidados intensivos

FIGURAS Y TABLAS

Figuras

Figura 1. Índice de resistencia a los medicamentos (IRM) en todos los países	10
Figura 2. Línea temporal del descubrimiento de antibióticos y la aparición de resistencia	11
Figura 3. IRM subyacentes para Suecia, EEUU e India, por clase de antibióticos	12
Figura 4. Muertes atribuibles a la resistencia antimicrobiana cada año	15
Figura 5. Estructura de membrana de los BGN	23
Figura 6. Representación de la formación de biofilm	26
Figura 7. Mecanismos de acción de fármacos reposicionados	41
Figura A1. Efecto de AOA-2 sobre la producción de citocinas	76
Figura A2. Efecto de AOA-2 sobre la respuesta inmune adaptativa	79
Figura A3. Ratio CD4+CD8+ del efecto de AOA-2	80

Tablas

Tabla 1. Factores de virulencia de <i>A. baumannii</i> y su papel en la patogénesis	29
Tabla 2. Factores de virulencia de <i>P. aeruginosa</i> y su papel en la patogénesis	29
Tabla 3. Factores de virulencia de <i>Enterobacteriales</i> y su papel en la patogénesis	29

RESUMEN

RESUMEN

El aumento de las tasas de resistencia antimicrobiana ha dibujado un escenario global donde la dificultad de encontrar un tratamiento eficaz para las infecciones causadas por bacilos gramnegativos (BGN), tales como *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* y especies de *Enterobacteriales* como *Escherichia coli* o *Klebsiella pneumoniae*, hace necesario tanto la investigación como el desarrollo de alternativas terapéuticas no antimicrobianas, que puedan ser utilizadas junto a las escasas opciones antibióticas disponibles. En esta Tesis Doctoral, con el propósito de indagar en estas alternativas, se tuvo como objetivo el estudio de dos tipos de opciones: i) la mejora de un agente que bloquea uno de los principales factores de virulencia de estos BGN y ii) reposicionar fármacos con el fin de darle un nuevo uso terapéutico, en este caso como antimicrobiano.

Previamente a la mejora del compuesto, se quiso estudiar el mecanismo de inhibición por el que inhibía a la proteína de membrana externa A (OmpA). En relación al primer enfoque terapéutico, se realizó el desarrollo de una librería de péptidos derivados del AOA-2, un compuesto inhibidor de la OmpA, que ya anteriormente se había descrito su actividad tanto *in vitro* contra *A. baumannii*, *P. aeruginosa* y *E. coli* como *in vivo* en un modelo experimental murino de infección por *A. baumannii*. En este contexto, se obtuvo una librería de diez compuestos derivados candidatos a mejorar la actividad *in vitro* de la molécula madre. Mediante los mismos ensayos *in vitro* descritos en el estudio donde se demostró la actividad de AOA-2, se realizaron diferentes ensayos de viabilidad celular y adherencia bacteriana que sirvieron de cribado para la evaluación de los mejores péptidos optimizados. Esto conllevó a que dos péptidos derivados, RW01 y RW06, mostraran los mejores resultados en los ensayos realizados contra los diferentes patógenos BGN, mejorando la actividad mostrada por AOA-2. Además, se llevó a cabo el estudio para comprobar si el tratamiento con AOA-2 afectaba de alguna manera a la respuesta del sistema inmune, tanto innato como adaptativo, del huésped. Los datos obtenidos no pudieron reflejar que este compuesto provocase algún hecho importante que tuviera que ver con el sistema inmune.

En cuanto al segundo enfoque terapéutico, se quiso evaluar dos compuestos pertenecientes a la familia de los antihelmínticos como candidatos a ser reposicionados como antimicrobianos o adyuvantes al tratamiento antimicrobiano. Por una parte, se demostró que la niclosamida es capaz de potenciar el efecto de la colistina contra las cepas sensibles a colistina (Col-S) y resistentes a colistina (Col-R) de *A. baumannii* y *K. pneumoniae*, debido a la alteración de la proporción de carga superficial negativa en la

RESUMEN

membrana externa de estas cepas. Por otra parte, la oxiclozanida potenció el efecto de la colistina en cepas Col-S y Col-R de *A. baumannii*, *P. aeruginosa* y *K. pneumoniae*. Este efecto podría deberse a una interrupción estructural de su envoltura celular. Estos resultados proporcionan nuevos conocimientos sobre el uso de estos antihelmínticos en combinación con colistina como una nueva alternativa para el tratamiento de las infecciones causadas por BGN.

En conjunto, los datos de esta tesis doctoral indican que tanto el bloqueo de los factores de virulencia bacteriana mediante péptidos inhibidores derivados de AOA-2 como el reposicionamiento de fármacos como la niclosamida o la oxiclozanida, podrían tratarse de opciones adyuvantes con las que poder hacer frente a las infecciones por BGN multirresistentes.

I. INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

1. Antibióticos y resistencia antimicrobiana: situación actual.

La resistencia antimicrobiana es un desafío mundial debido a su alta morbilidad y mortalidad en el ámbito clínico (1). Fuentes de prestigio como la Organización Mundial de la Salud (OMS) ya han advertido sobre esta circunstancia, haciendo hincapié en que cada vez más bacterias presentan resistencia a la mayoría o incluso a todos los medicamentos antimicrobianos disponibles en el mercado, aumentando el número de infecciones graves que anteriormente resultaban fácilmente tratables (2). Entre estas infecciones, podemos encontrar la neumonía comunitaria y nosocomial, la bacteriemia, infecciones del tracto urinario, cistitis e infecciones comunes neonatales. También es importante destacar las infecciones del sitio quirúrgico postoperatorio y pacientes que reciben tratamiento contra el cáncer, trasplante de órganos y otras terapias avanzadas que son vulnerables a la infección (2).

Según datos del Centro Europeo para la Prevención y Control de Enfermedades (ECDC; para *European Center for Disease Prevention and Control*), los porcentajes de microorganismos que presentan resistencia a los antimicrobianos, especialmente la multirresistencia, ha incrementado en Europa. La Red Europea de Vigilancia de Resistencia Antimicrobiana (EARS-Net; para *European Antimicrobial Resistance Surveillance Network*) muestra grandes variaciones en cuanto a porcentajes de resistencia antimicrobiana en Europa, dependiendo del microorganismo, el agente antimicrobiano y la región geográfica, lo que lleva a reflejar diferencias en el uso de antimicrobianos y las prácticas de control de infecciones según el país o el área geográfica (3). Más de la mitad (55,4%) de los aislamientos notificados de especies de *Acinetobacter* reportados a EARS-Net en 2016 por los países de la UE/EEE fueron resistentes a, al menos, uno de los grupos antimicrobianos bajo vigilancia regular (fluoroquinolonas, aminoglucósidos y carbapenémicos). Además, un tercio (33,9%) de los aislamientos de *Pseudomonas aeruginosa* informados a EARS-Net en 2016 fueron resistentes a al menos uno de los grupos antimicrobianos bajo vigilancia regular (piperacilina/tazobactam, fluoroquinolonas, ceftazidima, aminoglucósidos y carbapenémicos). En relación a *Enterobacteriales*, más de la mitad (58,6%) de los aislamientos de *Escherichia coli* y más de un tercio (34,5%) de los aislamientos de *Klebsiella pneumoniae* reportados a EARS-Net en 2016 fueron resistentes a, al menos, uno de los grupos antimicrobianos bajo vigilancia regular (aminopenicilinas,

INTRODUCCIÓN

fluoroquinolonas, cefalosporinas de tercera generación, aminoglucósidos y carbapenémicos) (4).

La situación de los bacilos gramnegativos (BGN) es especialmente preocupante debido al aumento de los porcentajes de resistencia antimicrobiana a nivel mundial (Figura 1) (5).

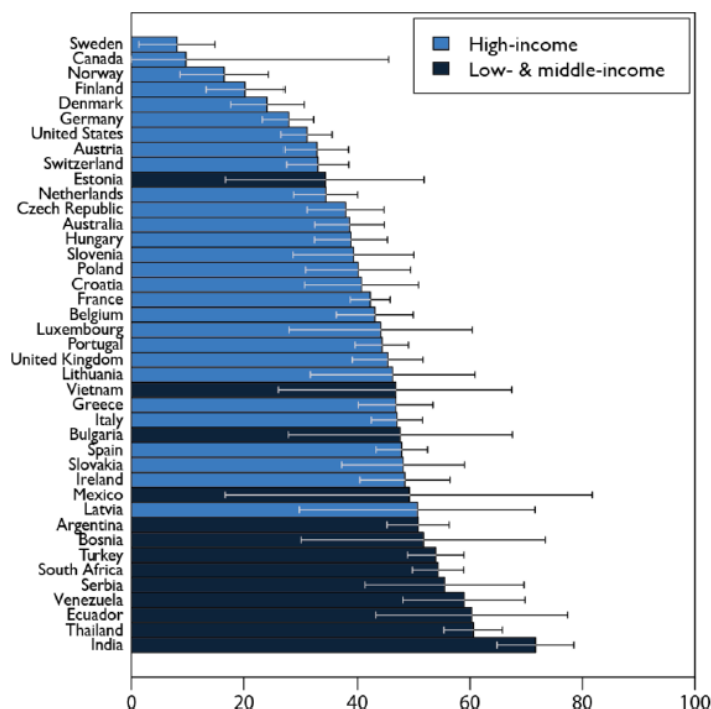


Figura 1. Índice de resistencia a los medicamentos (IRM) en todos los países. Cada barra informa del IRM para los países que reportan resistencia a los antibióticos para 5 o más patógenos y para 15 o más combinaciones de patógenos y antibióticos durante al menos 1 año entre 2012 y 2015. Se muestran los datos del año más reciente (5).

Este escenario conlleva a que las opciones terapéuticas de los pacientes infectados por BGN multirresistentes se limiten a un grupo reducido de antibióticos de última línea, como los carbapenémicos y que en los últimos 34 años no se han desarrollado nuevas familias antibióticas (Figura 2). Sin embargo, la resistencia a los carbapenémicos es considerada como un problema de salud pública de gran dimensión debido a la aparición de brotes graves con opciones de tratamiento muy limitadas (6).

INTRODUCCIÓN

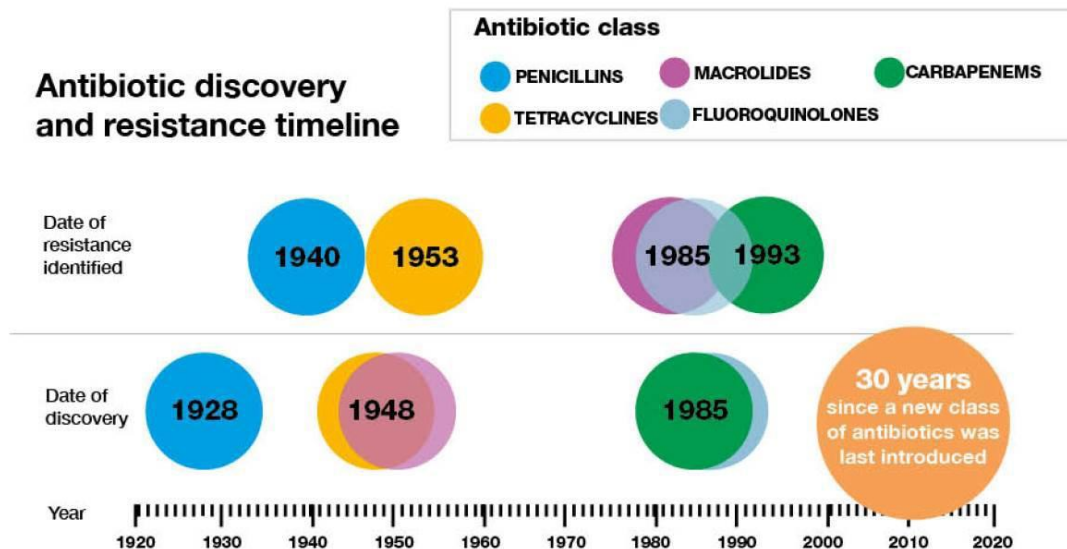


Figura 2. Línea temporal del descubrimiento de antibióticos y la aparición de resistencia. Figura extraída de “Health matters: antimicrobial resistance –GOV.UK”.

El uso de fármacos antimicrobianos ha sido utilizado de forma masiva durante varias décadas, y su mal uso tanto en los seres humanos como en la veterinaria ha favorecido la selección y propagación de bacterias resistentes (2). En 2013, el consumo de antimicrobianos para uso sistémico en la comunidad varió de 10,8 a 32,0 dosis diarias definidas (DDD) por 1.000 habitantes y por día, dependiendo del país (3). Durante ese mismo año en España, las DDD por 1.000 habitantes y por día fueron de 22,4 (3). Al igual que en años anteriores, las penicilinas fueron los antibióticos prescritos con más frecuencia en todos los países, mientras que la proporción de consumo de otras clases de antimicrobianos varió considerablemente entre los países; por ejemplo, cefalosporinas y otros betalactámicos, macrólidos, lincosamidas y estreptograminas y quinolonas. Recientemente, se ha destacado que aquellos países con un elevado consumo de antibióticos tienen un mayor nivel de resistencia a los mismos en comparación a los países con un bajo consumo de antibióticos (Figura 3) (5).

INTRODUCCIÓN

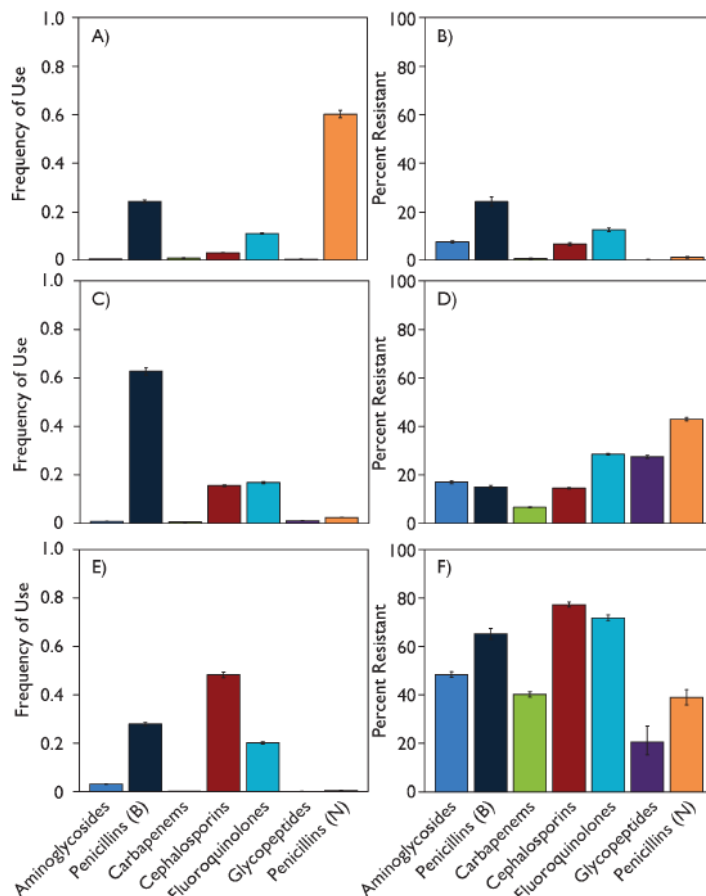


Figura 3. Índice de resistencia a los medicamentos (IRM) subyacentes para Suecia, Estados Unidos e India, por clase de antibióticos, en 2015. La fila superior (A, B) informa del uso de antibióticos y la resistencia a antibióticos para Suecia en 2015; la fila central (C, D) y la fila inferior (E, F) muestra la información correspondiente para Estados Unidos e India, respectivamente. Los gráficos de uso de antibióticos son la proporción de cada fármaco consumido del uso total de antibióticos incluido (5).

Esta circunstancia está conllevando a diferentes países a tomar medidas en la optimización del uso de los fármacos antimicrobianos, incluyendo campañas de concienciación sobre su utilización de forma correcta y prudente. Estas políticas radican en la necesidad de mejorar la vigilancia del consumo de antibióticos a nivel de cada hospital en los países de la Unión Europea (3). Un ejemplo regional en Andalucía (España) de puesta en marcha de este tipo de planes es el programa integral de prevención y control de las infecciones relacionadas con la asistencia sanitaria y uso apropiado de los antimicrobianos (PIRASOA) que se inició en el año 2014 (7).

En resumen, los altos niveles y sus tendencias de aumento de las resistencias antimicrobianas en BGN en Europa como en el resto de los continentes muestran la

INTRODUCCIÓN

pérdida continua de eficacia terapéutica de los tratamientos antimicrobianos, especialmente en las infecciones asociadas a la atención sanitaria, poniendo de manifiesto la urgente necesidad de estrategias de respuesta integral dirigidas a todos los sectores que engloban la salud (3).

2. Infecciones asociadas a la atención sanitaria (IAAs)

Las infecciones nosocomiales son aquellas infecciones que aparecen durante la hospitalización, que se manifiestan después de 72 horas o más de la admisión del paciente en el hospital, y que no estaban presentes ni en el período de incubación ni antes de la admisión del paciente (8). Estas infecciones se encuentran entre las principales complicaciones de la terapia médica moderna debido a la edad y la complejidad cada vez mayores de los pacientes, la mayor utilización de dispositivos invasivos y, con frecuencia, el uso inadecuado de la terapia antimicrobiana (9).

Constituyen una causa principal de morbilidad y mortalidad entre los pacientes hospitalizados (10). Se estima que aproximadamente 4.200.000 pacientes adquieren una IAA en la Unión Europea cada año, y el número de muertes que se producen como consecuencia directa de estas infecciones es de 175.000 (3, 11). Constituyen uno de los problemas más importantes que se pueden producir en los servicios que cuidan de los pacientes críticos, lo que lleva a un aumento de la estancia hospitalaria, de la mortalidad, y por supuesto a un aumento de los costes económicos en relación a la salud pública (12). Los costes de estas infecciones son una importante carga económica para las organizaciones hospitalarias. Estas infecciones representan aproximadamente un coste de siete billones de euros por año en Europa, considerando solamente los costes directos (3). Las IAAs más importantes son aquellas relacionadas con los dispositivos invasivos; infecciones del torrente sanguíneo denominadas bacteriemias, infecciones del tracto urinario asociadas a catéter, neumonía asociada a ventilación mecánica e infecciones del sitio quirúrgico. Muchas de estas infecciones asociadas a los dispositivos y sitio quirúrgico son causadas por organismos multirresistentes como *E. coli*, *P. aeruginosa*, *Clostridium difficile*, *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (SARM), y *Enterococcus* resistentes a vancomicina (9).

Hay múltiples factores que contribuyen a las IAAs; aquellos asociados a la atención médica, factores ambientales y los relacionados con el paciente. Los factores relacionados con la atención médica incluyen el uso de dispositivos invasivos, procedimientos quirúrgicos y la presión selectiva por el uso excesivo de antibióticos.

INTRODUCCIÓN

Los factores ambientales pueden ser sistemas de aire acondicionado contaminados y el diseño de la instalación hospitalaria. Los factores que tienen que ver con el paciente son aquellos relacionados con la severidad de la enfermedad, el uso de agentes inmunosupresores y las hospitalizaciones prolongadas (9). Todo lo referido al sistema de atención médica puede jugar un papel importante, así como la falta de programas de intervención efectivos diseñados para reducir estas IAAS.

En Estados Unidos, se estima que las IAAs ocurren en aproximadamente dos millones de pacientes al año con un número total de muertes de 99.000, suponiendo un coste de 33 billones de dólares cada año (13, 14).

Como estrategias para la reducción de las IAAs, se han utilizado enfoques amplios tales como la estrategia pasiva a través de protocolos de vigilancia y de respuesta rápida y oportuna (15). El estudio clásico que demostró la importancia de esto fue el Estudio para la Eficacia del Control de la Infección Nosocomial (SENIC), realizado en el año 1980 y publicado cinco años más tarde, financiado por el CDC, que incluyó 338 hospitales seleccionados al azar y estratificados por geografía, capacidad de camas para pacientes y el estado de enseñanza. En resumen, el estudio mostró que los programas de control de infecciones atendidos por epidemiólogos hospitalarios y los programas de vigilancia redujeron las infecciones nosocomiales en un 32% en comparación con aquellos entornos que carecían de programas de control de la infección (16). Se han llevado estudios recientes más concretos. Por ejemplo, en octubre de 2013, el Hospital Universitario de Carolina del Norte, con una instalación de 853 camas, implementó un nuevo programa de higiene de manos en todas las áreas para pacientes hospitalizados. La asociación entre el cumplimiento de la higiene de las manos y las IAAs, al ajustar los datos a nivel de unidad, mostró una mejora del 10% en la higiene de las manos, asociada con una reducción del 6% en el número general de IAAs (17).

3. Bacilos gramnegativos (BGN): epidemiología, resistencia antimicrobiana y virulencia.

La aparición de BGN multirresistentes crea un desafío en el tratamiento de las infecciones nosocomiales a nivel mundial. Esta circunstancia de emergencia global ha sido reportada por organizaciones gubernamentales como el Reino Unido, que en un informe sobre la resistencia antimicrobiana cataloga a esta misma como la causa potencial de mayor número de muertes en el año 2050 (Figura 4). Los BGN suponen una de las causas más comunes de las infecciones nosocomiales, especialmente en la

INTRODUCCIÓN

unidad de cuidado intensivo (UCI), incluyendo la mayoría de los casos de neumonía adquirida en el hospital e infecciones del tracto urinario y del 25% al 30% de las infecciones en el torrente sanguíneo y del sitio quirúrgico (18). Una de las causas más comunes de una IAA es la infección causada por bacterias como *A. baumannii*, *P. aeruginosa* y las Enterobacterias. Estas bacterias son consideradas como prioridad crítica para la investigación y el desarrollo de nuevos antibióticos por la OMS en 2017 (19).

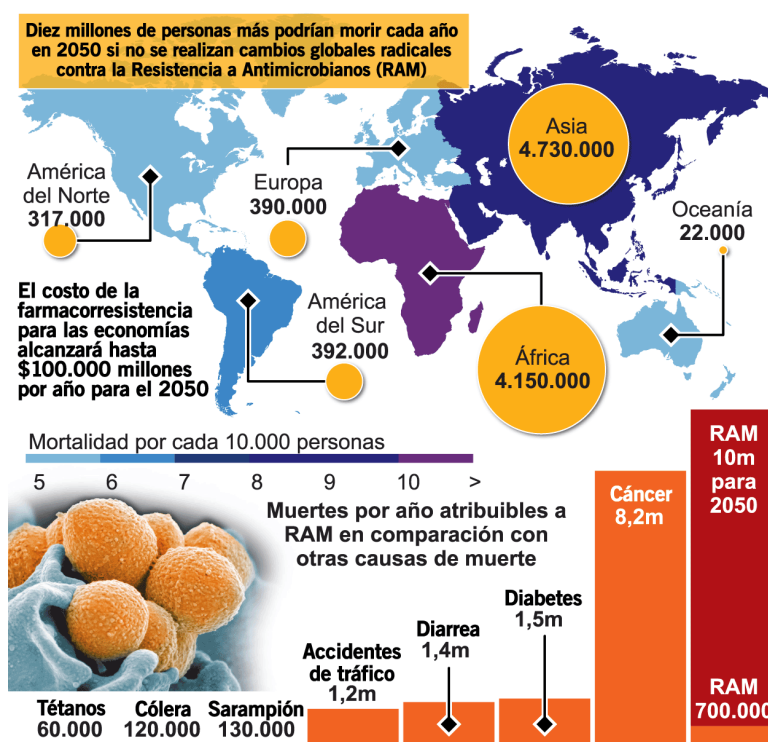


Figura 4. Muertes atribuibles a la resistencia a antimicrobianos cada año en comparación con otras causas importantes de muerte. Figura adaptada del informe “Review on Antimicrobial Resistance–GOV.UK”. (<https://www.graphicnews.com/es/pages/34294/SALUD-Las-superbacterias-matarán-a-10m--de-personas-más-por-año>).

3.1. *Acinetobacter baumannii*

3.1.1. Epidemiología

Las especies de *Acinetobacter* son cocobacilos gramnegativos aeróbicos, glucosa no fermentativos, catalasa-positivos y no oxidativos. Entre estas especies, *A. baumannii* es el miembro más importante asociado con las IAAs en todo el mundo (20, 21). La mayoría de las infecciones por *A. baumannii* ocurren en pacientes críticos en la UCI

INTRODUCCIÓN

(20, 22) y representan hasta el 20% de las infecciones en UCI en todo el mundo (20, 23). Además, la frecuencia de las infecciones adquiridas en la comunidad por *A. baumannii* ha ido aumentando gradualmente (20, 21). Este patógeno tiene una alta relevancia clínica debido a las infecciones graves que causa, tales como neumonía asociada a ventilación mecánica (NAVM) (24), bacteriemia, infecciones de piel y tejidos blandos, infecciones del sitio quirúrgico, infecciones del tracto urinario y sepsis (25), y con menor frecuencia, meningitis y endocarditis (26, 27). Las infecciones por *A. baumannii* son cada vez más frecuentes. Se han recogido tasas brutas de mortalidad del 30-75% debido a neumonía nosocomial causada por *A. baumannii*. Otros datos que se recogen muestran que la mortalidad atribuible a la infección por este patógeno oscila entre el 8% y el 43% (28).

3.1.2. Resistencia antimicrobiana

Muchos estudios han demostrado que *A. baumannii* desarrolla rápidamente resistencia antimicrobiana, habiéndose aislado cepas resistentes a múltiples antibióticos (24). La OMS declaró que *A. baumannii* es uno de los organismos *ESKAPE* (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *K. pneumoniae*, *A. baumannii*, *P. aeruginosa* y especies de *Enterobacter*), que evade de forma eficaz los efectos de los antibióticos (29).

Se conocen varios mecanismos de resistencia de *A. baumannii*, entre los que se incluyen la degradación enzimática de antibióticos (β -lactamasas y enzimas modificadoras de aminoglucósidos), modificaciones de la diana, bombas de eflujo o expulsión y cambios en la permeabilidad (21, 30). Estudios recientes han demostrado que *A. baumannii* muestra una competencia natural para incorporar ADN exógeno a altas frecuencias, lo que implica una transferencia de genes horizontal muy frecuente en este patógeno (31). La acumulación de varios mecanismos de resistencia en *A. baumannii* han disminuido gradualmente el número de clases de antibióticos disponibles para tratar las infecciones por este patógeno en la práctica clínica.

La inactivación de β -lactámicos por β -lactamasas es uno de los mecanismos más importantes de la resistencia antimicrobiana. En base a la homología de secuencia, las β -lactamasas se agrupan en diferentes clases moleculares: A, B, C y D (32).

Existe una amplia gama de β -lactamasas de clase A; incluidas las de “Temoneira” (TEM), la variable sulfhidrilo (SHV), la de capacidad de hidrolización de la cefotaxima (CTX-M), la “Guiana” de espectro extendido (GES), el plásmido autotransferible de *E.*

INTRODUCCIÓN

coli (SCO), la *Pseudomonas* de espectro extendido resistente (PER), β -lactamasa de espectro extendido de Vietnam (VEB), la carbenicilina de hidrolización de β -lactamasa (CARB) y la *K. pneumoniae* carbapenemasa (KPC). Aunque éstas se han reportado en *A. baumannii*, generalmente se consideran que desempeñan un papel menor en su fenotipo de resistencia, especialmente en resistencia a carbapenemas (33).

Las β -lactamasas de clase B pueden conferir resistencia a la mayoría de los β -lactámicos debido a su amplio rango, su potente actividad carbapenemasa y la resistencia a los inhibidores. Aunque las metalo β -lactamasas (MBL) no son las carbapenemasas predominantes en *A. baumannii*, se ha encontrado la metalo- β -lactamasa tipo VIM, la imipenemasa (IMP) y la imipenemasa de Seúl (SIM), contribuyen a la resistencia de alto nivel a los carbapenemas. Más recientemente, se identificaron NDM (nueva Deli metalo- β -lactamasa) en *A. baumannii*. El gen *bla*_{NDM} está integrado en el cromosoma dentro de una nueva estructura de transposón con dos copias de la secuencia de inserción ISAbal25 en una cepa clínica de *A. baumannii*. Tal variabilidad del entorno genético de *bla*_{NDM-1} es el responsable de su rápida difusión (33).

La secuencia de nucleótidos del gen de la cefalosporinasa cromosómica, que codifica una β -lactamasa AmpC, se caracterizó en *A. baumannii* por primera vez en un aislado clínico de España en el año 2000. Se ha demostrado que diferentes aislados de *A. baumannii* tienen secuencias de AmpC casi idénticas (no más de dos sustituciones de aminoácidos). Un análisis filogenético mostró que los genes de *Acinetobacter ampC* descienden de un ancestro común y están más estrechamente relacionados entre sí que los genes de *ampC* que se encuentran en otras especies de bacterias. La presencia de AmpC juega un papel importante en la resistencia de β -lactámicos en *A. baumannii*. La presencia de una secuencia de inserción con un promotor fuerte “*upstream*” de *ampC* en aislamientos clínicos de *A. baumannii* tiene el potencial de sobreexpresar AmpC, lo que resulta en una resistencia a ceftazidima de alto nivel (33).

Las enzimas modificadoras de aminoglucósidos son el principal mecanismo por el cual *A. baumannii* confiere resistencia a estos antibióticos. Estas enzimas se pueden clasificar en acetiltransferasas, adeniltransferasas y fosfotransferasas. Están típicamente presentes en elementos transponibles y se transfieren entre bacterias patógenas. Varios estudios han mostrado que muchos aislados de *A. baumannii* multirresistentes producen una combinación de enzimas modificadoras de aminoglucósidos (20, 21, 34).

En relación a la resistencia a polimixina, la modificación del lípido A, un componente del lipopolisacárido (LPS), con la adición de la 4-amino-4-desoxi-L-arabinosa (Ara4N)

INTRODUCCIÓN

y/o la fosfoetanolamina se considera el mecanismo de resistencia a la colistina en BGN. Sin embargo, los genes de unión y biosíntesis de Ara4N no están presentes en *A. baumannii*, lo que sugiere que la modificación de lípido A por Ara4N no es adecuada para explicar la resistencia a la colistina en *A. baumannii*. Debido a esto, existen dos hipótesis principales sobre el mecanismo de resistencia a colistina en este patógeno; la primera es la pérdida de LPS debido a la inactivación de un gen de biosíntesis del lípido A, *lpxA*, *lpxC* o *lpxD*, que da como resultado la pérdida completa de la producción de LPS en *A. baumannii*, y la segunda es la hipótesis mediada por el sistema de dos componentes PmrAB. Al comparar la secuencia de ADN de los genes que codifican PmrA y PmrB entre las cepas susceptibles y resistentes a la colistina, se pudo demostrar que las mutaciones en los genes *pmrA* y *pmrB* están relacionadas con la resistencia a la colistina en *A. baumannii* (35).

Las modificaciones en los sitios de la diana terapéutica también pueden inducir resistencia a antibióticos en *A. baumannii*. En ausencia de otros mecanismos de resistencia conocidos, se ha demostrado que la sobreexpresión de proteínas de unión a penicilina alteradas con baja afinidad por imipenem induce resistencia a imipenem. Las bombas de eflujo están asociadas con resistencia contra muchas clases diferentes de antibióticos, como imipenem y tigeciclina en este patógeno. Cuatro categorías de bombas de eflujo, entre las que se encuentran AdeABC, AdeM, TetA, TetB y AbeS, están relacionadas con la resistencia antimicrobiana en *A. baumannii* (20).

Debido al rol de las porinas sobre la permeabilidad de la membrana, también juegan un papel importante en el mecanismo de resistencia. La expresión reducida de algunas porinas como CarO, Omp22-33, Omp33-36, Omp37, Omp43, Omp44 y Omp47 se asocia con resistencia a carbapenemas en *A. baumannii* (20, 36-38).

La resistencia a la quinolonas se ha asociado con modificaciones en GyrA (una subunidad de la ADN girasa) y ParC (una subunidad de la topoisomerasa IV) en aislamientos de *A. baumannii* no relacionados epidemiológicamente (20).

3.2. *Pseudomonas aeruginosa*

3.2.1. Epidemiología

P. aeruginosa es un patógeno oportunista que normalmente habita en el suelo y en las superficies de ambientes acuáticos. Su adaptabilidad y su alta resistencia intrínseca a los antibióticos le permiten sobrevivir en una amplia gama de entornos naturales y artificiales, incluidos las superficies de las instalaciones médicas. Las infecciones por *P.*

INTRODUCCIÓN

aeruginosa a menudo son nosocomiales, y casi todas están asociadas con defensas del huésped comprometidas, tales como neutropenia, quemaduras graves o fibrosis quística (39). Estas infecciones se caracterizan por periodos de hospitalización largos y con un alto coste en relación a la atención médica. Las infecciones debidas a esta bacteria frecuentemente causan neumonía e infecciones del tracto respiratorio inferior que pueden ser graves e incluso letales en huéspedes inmunocomprometidos. También causa infecciones pulmonares crónicas en pacientes con fibrosis quística, infecciones del tracto urinario, choque gastrointestinal, shock séptico, bacteriemia, septicemia, osteomielitis, peritonitis, infecciones de piel y tejidos blandos (40,41).

Los datos proporcionado por el ECDC en el informe epidemiológico de 2014 sobre los diez microorganismos aislados con más frecuencia en infecciones en UCI, mostraron que *P. aeruginosa* fue el primer agente etiológico común aislado en los episodios de neumonía adquiridas en UCI en Europa (16,6%) y en España (24,6%) (3). Además, en otros países como Estados Unidos, se ha informado que las tasas de mortalidad por NAV y por bacteriemia causada por *P. aeruginosa* varían entre 34-68% y 18-61%, respectivamente (42, 43).

3.2.2. Resistencia antimicrobiana

Se han demostrado diferentes mecanismos de resistencia antimicrobiana en *P. aeruginosa*, entre los que se encuentran la hidrólisis de las β -lactamasas, la pérdida de expresión de porinas y la sobreexpresión de bombas de eflujo como principales mecanismos de resistencia antimicrobiana.

P. aeruginosa alberga una cefalosporinasa de tipo AmpC inducible que puede desrepresionarse después de mutaciones en el sistema de regulación (44). La resistencia a la tobramicina se produce principalmente a través de la adquisición de enzimas modificadoras de aminoglicósidos, mientras que la resistencia a la amikacina depende principalmente de la sobreexpresión de las bombas de eflujo, como MexXY (45, 46). *P. aeruginosa* tiene varios sistemas de eflujo de tres componentes, algunos de los cuales confieren resistencia a los β -lactámicos cuando se expresan fuertemente después de mutaciones en sus regiones promotoras (47). El sistema más frecuentemente involucrado es MexAB-OprM, cuya sobreexpresión confiere resistencia a ticarcilina, aztreonam, cefepima y meropenem (47).

Por otra parte, la resistencia a fluoroquinolona es debida a mutaciones en los genes que codifican la topoisomerasa y/o la hiperexpresión de los sistemas de eflujo (48). Además,

INTRODUCCIÓN

pueden aparecer mutantes resistentes a la colistina de *P. aeruginosa* en entornos con alta frecuencia de uso de colistina (49). Varios estudios han demostrado que *P. aeruginosa* puede desarrollar resistencia a las polimixinas a través de la modificación constitutiva de su LPS, que es estimulada por los sistemas de secreción de pmrA/pmrB y phoP/phoQ. Además, se ha informado que los sistemas reguladores de dos componentes ColR/ColS y CprR/CprS median la resistencia en *P. aeruginosa* directa o indirectamente. Se ha observado que las mutaciones en estos dos sistemas contribuyen a altos niveles de resistencia a la polimixina en aislamientos mutantes de *phoQ* (49). También, se ha demostrado que el sistema parR/parS está implicado en la resistencia adaptativa a polimixinas, ya que puede causar la sobrerregulación del operón de modificación de LPS bajo una concentración subinhibitoria de polimixinas (49). Además, con respecto a la modificación de las porinas, se ha demostrado que la pérdida de la porina OprD en este patógeno controla el paso de imipenem a través de la membrana externa (48).

3.3. *Enterobacteriales*

3.2.1. Epidemiología

Enterobacteriales es una familia de BGN que incluye patógenos como *E. coli*, *K. pneumoniae*, *Salmonella typhimurium*, especies de *Enterobacter*, *Serratia marcescens* y *Proteus mirabilis*, entre otros. Son anaerobios facultativos, fermentadores de carbohidratos, no forman esporas y la mayoría tienen flagelos. Muchos de ellos son parte de la microbiota intestinal del ser humano, mientras que otros se encuentran en el agua o en el suelo. Además, algunas especies de *Enterobacteriales* son productoras de toxinas. Las especies más importantes con respecto a la práctica clínica son *E. coli* y *K. pneumoniae* (50, 51). El Estudio Español de Prevalencia de Infecciones Nosocomiales (EPINE) de 2017 mostró que *E. coli* es el primer patógeno aislado (19,50%) con mayor frecuencia (52). Esta situación es similar a la de Europa. El informe epidemiológico anual de 2014 del ECDC destaca que *E. coli* es el primer patógeno de las IAAs con mayor frecuencia (15,9%). En cuanto a *K. pneumoniae*, según el informe de vigilancia anual más reciente del ECDC (4), países como Grecia tuvieron el porcentaje más alto de aislamientos resistentes a carbapenemas de *K. pneumoniae* invasiva en Europa pero, y aunque con una tendencia decreciente desde 68,2% en 2011 al 61,9% en 2016, este porcentaje sigue siendo muy alto.

INTRODUCCIÓN

En Estados Unidos, ocurren cada año aproximadamente 140.000 infecciones por Enterobacterias asociadas a la atención médica; aproximadamente 26.000 y 9.300 de estos son causados por Enterobacterias productoras de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) y *Enterobacteriales* productoras de carbapenemasas (EPC), respectivamente. Hasta el 57% y el 50% de todas las bacteriemias causadas por Enterobacterias productoras de BLEE y EPC causaron la muerte, respectivamente (53). Esta cifra fue mayor en un estudio de cohorte multicéntrico español, con una tasa de mortalidad por *E. coli* y especies de *Klebsiella* productoras de BLEE que produjeron bacteriemia del 21% (54).

3.3.2. Resistencia antimicrobiana

Desde la perspectiva de la resistencia a los antimicrobianos, la familia *Enterobacteriales* es especialmente importante ya que son una causa común de infecciones asociadas a la comunidad y relacionadas con la asistencia sanitaria. En los últimos años, hemos sido testigos de la aparición de especies de EPC (55). Es típico encontrar especies de *Enterobacteriales* que producen OXA-48, que hidroliza penicilinas y carbapenemas. Además, todas las *Enterobacteriales* son naturalmente susceptibles a las quinolonas y las fluoroquinolonas. La resistencia de alto nivel emerge después de sucesivas mutaciones cromosómicas en los genes que codifican para la girasa y la topoisomerasa del ADN; *gyrA* y *parC*, respectivamente (56). La resistencia a carbapenémicos implica múltiples mecanismos, incluida la producción de carbapenemasas, por ejemplo, KPC, NDM, VIM, OXA-48, así como alteraciones en la permeabilidad de la membrana externa mediada por la pérdida de porinas, como por ejemplo OmpK35 y OmpK36, y la regulación positiva de sistemas de eflujo. Los últimos dos mecanismos suelen combinarse con altos niveles de otros tipos de β -lactamasas, por ejemplo, AmpC. *K. pneumoniae* ST258 surgió durante la primera mitad de la década de 2000 como un importante patógeno humano y se ha extendido ampliamente por todo el mundo. El tratamiento óptimo de las infecciones debidas a EPC permanece aún desconocido. Existen agentes nuevos que se muestran prometedores para tratar las infecciones debidas a los productores de KPC; sin embargo, las opciones efectivas para el tratamiento de productores de NDM siguen siendo difíciles de alcanzar (57).

En una cepa de *K. pneumoniae* resistente a las polimixinas genéticamente no caracterizada, ésta contenía cinco veces más grupos fostatos del lípido A que en cepas sensibles a polimixinas. Esta alteración de la composición de la membrana es conocida

INTRODUCCIÓN

por reducir la carga de la membrana externa (49). Además, la caracterización molecular de las alteraciones estructurales de LPS en *K. pneumoniae* con respecto a la resistencia a polimixina ha mostrado la participación de *phoP/phoQ* y *pmrA/pmrB*. Se ha observado que los sistemas *phoP/phoQ* y *pmrA/pmrB* están sobrerregulados en cepas de *K. pneumoniae* expuestas a polimixinas (49). Otro mecanismo molecular que conduce a la aparición de resistencia a la colistina en *K. pneumoniae* que se ha descubierto recientemente es la mutación/inactivación del gen *mcrB* (49). En *E. coli*, la modificación del lípido A también está relacionada con la resistencia a polimixina. Etk, una tirosina quinasa, se ha observado que fosforila a PmrE, por lo tanto, participa en la resistencia de *E. coli* a polimixina (49). Curiosamente, Etk se expresa en condiciones secundarias para activar el sistema PmrA/PmrB. Este hallazgo indica que, aparte del sistema PmrA/PmrB, la resistencia a polimixina debido a la modificación de LPS con L-Ara4N puede estar parcialmente regulada con Etk (49). *mcrR* es otro determinante genético que se ha demostrado que media en la resistencia a la polimixina en *E. coli* (49). Además, recientemente se ha demostrado la existencia de plásmidos portador del gen *mcr*, que codifican para una fosfoetanolamina transferasa, que confieren resistencia a colistina (58).

3.4 Mecanismos de virulencia de BGN

Los BGN usan sus factores de virulencia para primero colonizar y luego infectar al huésped, causando de esta forma la enfermedad (59). Diferentes estudios de genómica, transcriptómica y proteómica en animales o modelos de infección han ayudado a identificar fenotipos o factores de virulencia que participan en la patogénesis de los BGN. Debido al aumento de las tasas de resistencia antimicrobiana con estos patógenos y la falta de tratamientos para combatir las infecciones que producen, es importante la identificación de nuevos factores de virulencia para caracterizar la patogénesis en profundidad y determinar nuevas dianas terapéuticas que permitan el control de estas infecciones.

Existen varios mecanismos de patogenicidad y virulencia en BGN (Tabla 1, Tabla 2 y Tabla 3); los principales factores se describen a continuación:

3.4.1. Proteínas de membrana externa

Los BGN contienen una doble membrana que sirve tanto de protección como para proporcionar nutrientes. Además de considerarse como la primera línea de contacto

INTRODUCCIÓN

entre las bacterias y su entorno externo, la membrana externa funciona como una barrera selectiva que impide la entrada de muchas moléculas tóxicas en la célula, mientras que, por otra parte, permite la entrada de nutrientes necesarios para la supervivencia celular (Figura 5). La membrana externa se compone principalmente por proteínas, denominadas proteínas de membrana externa (OMP) o porinas, que tienen funciones esenciales para la célula, incluyendo la absorción de nutrientes, la adhesión celular, la señalización celular y la exportación de residuos (60). Por otra parte, en las cepas patógenas, muchas de estas OMPs también sirven como factores de virulencia para la captación de nutrientes y la evasión de los mecanismos de defensa del huésped (61).

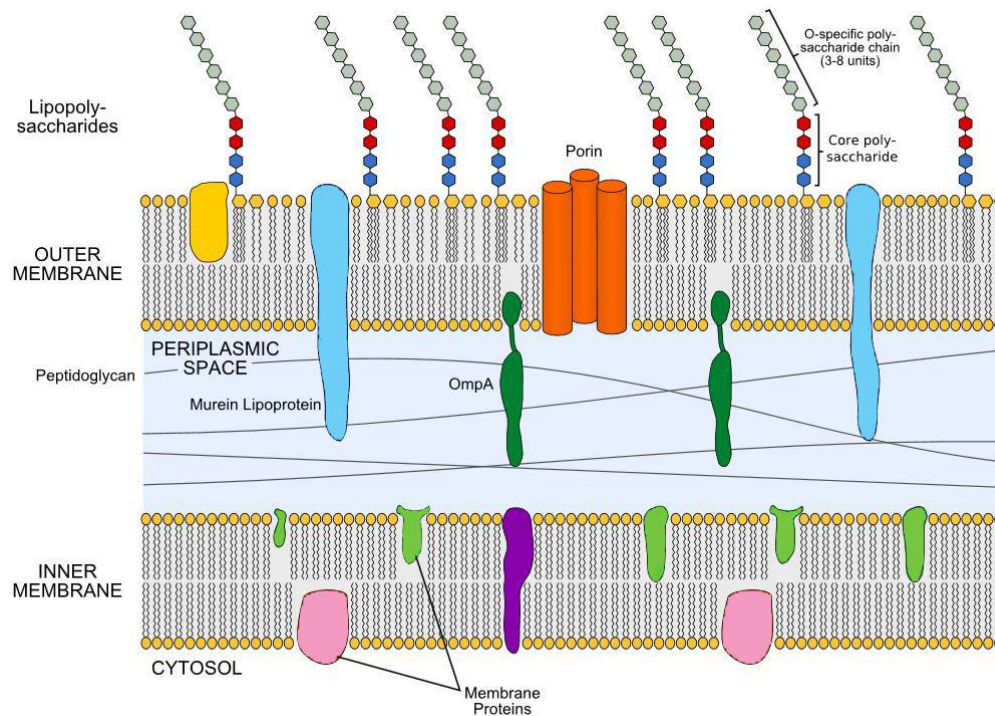


Figura 5. Estructura de membrana de los BGN (https://en.wikipedia.org/wiki/Gram-negative_bacteria).

Entre las OMPs, encontramos a la OmpA como un importante factor de virulencia de BGN. Esta OmpA, altamente conservada entre diferentes especies, es la proteína más abundante en la superficie bacteriana, y se le atribuye una multitud de funciones (62). Desempeña un papel importante en la adherencia y la invasión de *A. baumannii* en células epiteliales e induce la apoptosis y la citotoxicidad, perjudicando la mitocondria y

INTRODUCCIÓN

el núcleo de las células eucariotas (63-65). Esta proteína se moviliza a través de vesículas de membrana externa (OMV) de *A. baumannii* para alcanzar el huésped y realizar su actividad citotóxica (65). Además, está implicada en la formación de *biofilm* (63). Además, se ha demostrado su contribución en el fenotipo de resistencia antimicrobiana de *A. baumannii* (66) y su implicación en la virulencia tanto *in vitro* como *in vivo* (67). Otra importante OMP es la Omp33-36, que induce la apoptosis en células eucariotas (67) y también está implicada en la virulencia bacteriana (68). Además, se ha demostrado que la subexpresión de las porinas CarO y OprD atenúa la virulencia de una cepa de *A. baumannii* panresistente (69).

En *P. aeruginosa*, la OprF, una proteína homóloga a la OmpA, es requerida para la virulencia de este patógeno (70). Actúa en parte a través de la modulación de la red de detección de *quorum sensing* (70). Otros estudios han demostrado que OprF está implicada en la adhesión de *P. aeruginosa* a las células del huésped (71). Otro componente importante de la membrana exterior es MexAB-OprM. Es la bomba de eflujo más frecuente que confiere resistencia a betalactámicos (72). Además, la porina OprD es una porina sustrato-específica que se ha demostrado su labor en la difusión de aminoácidos básicos, pequeños péptidos que contienen estos aminoácidos, y carbapenemas en las células. Su deficiencia confiere a *P. aeruginosa* un nivel basal de resistencia a carbapenemas, especialmente a imipenem (73, 74).

En especies de *Enterobacteriales* como *E. coli*, se ha evidenciado que las OMPs son capaces de promover la resistencia bacteriana a la inmunidad innata, tales como OmpA, OmpW, OmpX y OmpF. La importancia de OmpA en la patogenicidad de *E. coli* se ha establecido en numerosos sistemas modelo. Esta proteína es un factor destacado de virulencia en cepas de *E. coli* causantes de meningitis, con funciones en la adhesión y la invasión del endotelio capilar del sistema nervioso central y de los astrocitos (75-77). La OmpA también está implicada en la adhesión de *E. coli* enteropatógena a las células epiteliales en las superficies mucosas, leucocitos y macrófago (78). Por otra parte, se ha podido demostrar también que durante la infección del tracto urinario, la expresión de OmpA en las cepas se incrementó 20-30 veces después de la infección (79). Además, en los mutantes dobles de delección de *ompA* y *tcdA*, un activador transcripcional, se redujo la capacidad de adhesión de *E. coli* a las células del huésped (80).

INTRODUCCIÓN

3.4.2. Adherencia bacteriana y formación de *biofilm*

La capacidad de las bacterias para interactuar con las células eucariotas es el primer paso en el proceso de la patogénesis, seguido de su internalización en el huésped. Las bacterias invasoras alcanzan un compartimento en el que están protegidas contra los mecanismos de aclaramiento del huésped, pudiéndose así replicar y prepararse para acceder tanto a los tejidos como al sistema circulatorio.

Hay diferentes estructuras, tanto desde el patógeno como de la célula huésped, por el cual las bacterias permiten su adherencia a la célula eucariota. Algunos de estos componentes bacterianos son la OmpA, estructuras pili y y de tipo fimbria (63, 81, 82). Por otra parte, también hay factores del huésped en la superficie celular que pueden mediar la adherencia bacteriana; tales como la integrina y fibronectina (83, 84). En este escenario, se ha demostrado que *A. baumannii*, expresando fosforilcolina en la membrana externa, se une a las células epiteliales de pulmón humano a través de del receptor de activación de plaquetas, la activación de la clatrina y arrestinas beta (85).

Como muestra la figura 6, una vez que las primeras bacterias se adhieren a la superficie biótica y abiótica, el *biofilm* comienza a formarse. Estos *biofilms* son comunidades bacterianas unidas a la superficie dentro de una matriz de exopolisacáridos, proteínas y ADN extracelular (86), que confiere a las bacterias un mecanismo de protección para sobrevivir en ambientes desfavorables y durante la infección.

El material de esta matriz, aunque es producido por las células individuales, forma estructuras que proporcionan beneficios para toda la comunidad, siendo responsable de que un antibiótico no sea eficaz contra estas bacterias (87). Estos *biofilms* son complejos y dinámicos (88), ya que las células que lo conforman no son estáticas y son heterogéneas. Esta capacidad permite que las bacterias colonicen equipamientos hospitalarios (89) y también superficies bióticas, como las células epiteliales (90).

INTRODUCCIÓN

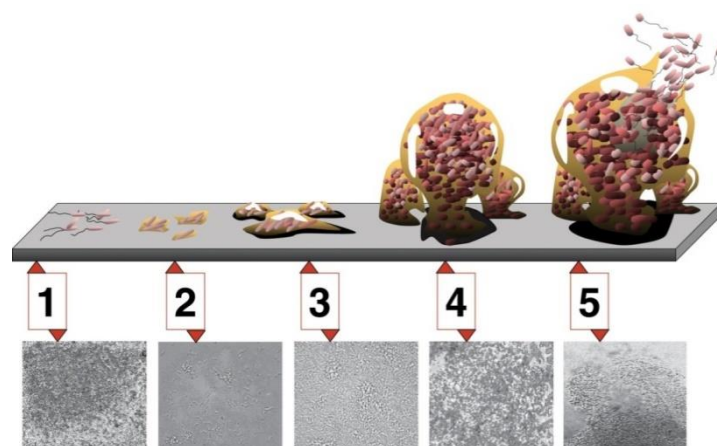


Figura 6. Representación de la formación de biofilm. La formación de biofilm comienza con [1] bacterias individuales flotantes que se disponen en una superficie. [2] Estas células bacterianas se agregan y se unen a la superficie, y [3] crecen y se dividen para la formación de biofilm. [4] Representa una formación de biofilm madura, y [5] parte del biogilm se dispersa para liberar bacterias flotantes libres para una mayor colonización (<https://es.wikipedia.org/wiki/Biopelícula>).

Se ha demostrado que algunos genes están implicados en la formación de *biofilms*. Los sistemas de regulación de dos componentes y reguladores transcripcionales relacionados con los genes asociados con biofilm son de gran importancia (91). El gen más importante de *A. baumannii* es *CsuE*, que es el componente del complejo *CsuA/BABCDE*. Este gen está implicado en la producción de los pili, y su inactivación provoca que no pueda formarse el biofilm (92). También se ha descrito en *A. baumannii* que la *OmpA* participa en la formación de biofilms en las superficies de plástico, y que es esencial para la adhesión a las células epiteliales del pulmón humano (82). En *P. aeruginosa* hay un grupo de genes, como *cupA*, que se requiere para la formación de biofilms en superficies abióticas, que está regulado por el regulador transcripcional *MvaT*, así como su implicación en el control de la formación de biofilms y la maduración en *P. aeruginosa* (93). En *E. coli* se ha establecido que la proteína *CsrA* sirve como un regulador en la formación de biofilms (94).

3.4.3. Motilidad

Para moverse activamente sobre las superficies, las bacterias emplean varios comportamientos como “*swarming*”, “*swimming*”, “*twitching*”, “*gliding*” y “*sliding*” (95). El “*swarming*” y el “*twitching*”, las principales actividades de la motilidad, se producen sobre superficies blandas y húmedas. El “*swarming*” es usualmente el

INTRODUCCIÓN

movimiento de propulsión causado por la rotación de los flagelos (96), mientras que el “*twitching*” es producido por la extensión de los pili de tipo IV (97). El “*swimming*” es el movimiento de bacterias individuales en líquido, alimentado por flagelos giratorios. El “*gliding*” es el movimiento en la superficie activa que no requiere flagelos o pili y consiste en complejos de adhesión focal. El “*sliding*” es la translocación de superficie pasiva que es alimentado por el crecimiento y facilitado por un agente surfactante (95). *P. aeruginosa* posee un flagelo polar y múltiples pili de tipo IV (98), por lo que moverse mediante motilidad de tipo “*swarming*” o “*twitching*”. *P. aeruginosa* conserva su flagelo polar pero sintetiza un motor alternativo requerido específicamente para moverse en las superficies y a través de entornos viscoso (99). Por el contrario, *A. baumannii* no tiene flagelo, y se ha demostrado que tiene la motilidad de tipo “*twitching*” (100). Sin embargo, *E. coli* utiliza múltiples flagelos orientados axialmente a lo largo del cuerpo de la célula para propulsarse a través de líquidos (101). Por el contrario, *K. pneumoniae* se considera no motil, aunque se ha descrito algún estudio en el que se evidencia una motilidad de tipo “*swimming*” gracias a un flagelo polar (102).

3.4.4. Lipopolisacárido

El lipopolisacárido (LPS), que está presente en la membrana externa de los BGN, juega un papel importante en su virulencia. Está compuesto por tres dominios estructurales: un dominio hidrófobo conocido como lípido A (o endotoxina), un núcleo oligosacárido y un antígeno-O altamente variable constituido por unidades repetitivas de oligosacáridos (103).

Se ha demostrado su toxicidad letal en ratones, pirogenicidad en conejos y la inactivación del complemento *in vivo* (104). Además, el LPS activa la respuesta inmune innata (105). Además, se sabe que la resistencia a la colistina en BGN es más común debido a la pérdida de LPS o a su modificación, causada por cambios en *phoPQ* y *PmrAB*, lo que resulta en un lípido A menos aniónico (106-108).

3.4.5. Vesículas de membrana externa

Las OMVs son nanovesículas esféricas, con un diámetro de entre 20 y 200 nm, de la membrana externa, que tienen contenido periplásmico, y se producen comúnmente en BGN (109). Su composición es ADN, ARN, lípidos, LPS e incluso OMPs (110). Estas vesículas pueden transportar factores de virulencia y participar en la formación de biofilms así como en la transferencia de genes de resistencia a los antimicrobianos

INTRODUCCIÓN

(111). Por lo tanto, las OMVs tienen gran relevancia no sólo debido a su importancia en la interacción huésped-patógeno, sino también por su capacidad para difundir los genes de resistencia.

3.4.6. Sideróforos

Los sideróforos son moléculas de bajo peso molecular quelantes de hierro, de alta afinidad, esenciales en muchos BGN. Su función se ha definido como la quelación y entrega de hierro a las bacterias para su proliferación (112). Es bien conocido que el hierro es esencial para el crecimiento de las bacterias, por lo que estos microorganismos han desarrollado sistemas de adquisición de hierro altamente eficientes, también con el objetivo de obtener hierro del exterior de la propia bacteria (113). Se han identificado diferentes sideróforos en *A. baumannii*, como la acinetobactina, acromobactina y fimsbactina A-F, así como la pioverdina y pioquelina en *P. aeruginosa* o la enterobactina y la aerobactina en *E. coli* (113).

3.4.7. Quorum sensing

El *quorum sensing* (QS) es un mecanismo de las bacterias para comunicarse de célula a célula mediante la excreción de compuestos químicos (114). Es utilizado por las bacterias para coordinar la expresión de varios rasgos colectivos, incluyendo la producción de múltiples factores de virulencia, la formación de *biofilms* y de motilidad, una vez que se alcanza un umbral de población (115). El QS depende de la producción, secreción y detección de pequeños autoinductores difusibles, tales como lactonas acil-homoserinas (AHL), oligopéptidos autoinductores (AIP) y el autoinductor-2 (AI-2). Estas AHLs se producen en *A. baumannii* y *P. aeruginosa* por la familia LuxI, que interactúa con LuxR (116), mientras que AI-2 se produce en *E. coli* y *K. pneumoniae* (117). Existen evidencias tanto *in vitro* como *in vivo* que relacionan a los sistemas de QS con infecciones humanas (118). Por otra parte, se ha sugerido que el QS y los sistemas de regulación de la multirresistencia antibiótica podrían tener alguna relación evolutiva y una especial relevancia biológica debido a que los antibióticos también actúan como moléculas señal, y las bombas de eflujo para estos fármacos son también los exportadores para señales de QS (119).

INTRODUCCIÓN

Tabla 1. Principales factores de virulencia de *A. baumannii* y su papel en la patogénesis.

Factor de virulencia	Papel en la patogénesis
Porinas (OmpA, Omp33-36, Omp22, CarO, OprD-like)	Adherencia e invasión, inducción de apoptosis, resistencia sérica, formación de <i>biofilm</i> , persistencia
Polisacárido capsular	Crecimiento en suero, supervivencia en infección del tejido, formación de <i>biofilm</i>
Lipopolisacárido (LPS)	Resistencia sérica, supervivencia en infección del tejido, evasión de la respuesta inmune del huésped
Fosfolipasa (C y D)	Resistencia sérica, invasión, supervivencia <i>in vivo</i>
Vesícula de membrana externa	Liberación de factores de virulencia, transferencia horizontal de resistencia antibiótica génica
Sistema de adquisición de hierro (acinetobactina y NfuA)	Supervivencia <i>in vivo</i> , persistencia, killing de células del huésped
Sistema de adquisición de zinc (ZnuABC y ZigA)	Supervivencia <i>in vivo</i>
Sistema de adquisición de manganeso (MumC y MumT)	Supervivencia <i>in vivo</i>
Sistema de secreción tipo II	Supervivencia <i>in vivo</i>
Sistema de secreción tipo VI	Killing de bacterias competidoras, colonización del huésped
Sistema de secreción tipo V	Formación de <i>biofilm</i> , adherencia
Proteína de unión a penicilina 7/8 y β -lactamasa PER-1	Resistencia sérica, supervivencia <i>in vivo</i> , adherencia
CipA	Resistencia sérica, invasión
Tuf	Resistencia sérica
RecA	Supervivencia <i>in vivo</i>
SurA1	Resistencia sérica, supervivencia <i>in vivo</i>
GigABCD	Supervivencia <i>in vivo</i> , killing de células del huésped
UspA	Supervivencia <i>in vivo</i> , killing de células del huésped
Pili	Adherencia, formación de <i>biofilm</i>
OmpR/EnvZ	Killing de células del huésped
FhaBC	Adherencia, killing de células del huésped
AbeD	Killing de células del huésped

Tabla 2. Principales factores de virulencia de *P. aeruginosa* y su papel en la patogénesis.

Factor de virulencia	Papel en la patogénesis
Sistema de secreción tipo III	Inyección de proteínas efectoras en las células del huésped
LasR	<i>Quorum sensing</i>
RpoN	Motilidad
PvdS, PhuR	Adquisición de hierro
AlgU	Formación de <i>biofilm</i>
RetS	Formación de <i>biofilm</i>
MucA	Formación de <i>biofilm</i>
ExoA, ExoS	Daño tisular, inhibición de la síntesis proteica
LasA, LasB	Daño tisular. Degradación de elastina
Fosfolipasa C	Daño tisular. Disminución de la actividad de neutrófilos en el aparato respiratorio.
Ramnolípido	Implicado en la infección pulmonar

Tabla 3. Principales factores de virulencia implicados en la patogénesis de *Enterobacteriales*.

Factor de virulencia	Papel en la patogénesis
Cápsula	Inhibe y evade la fagocitosis por las células del huésped, induce la maduración de células dendríticas, neutraliza la actividad antibacteriana de la defensa del huésped
LPS	El antígeno O proporciona resistencia sérica
Sideróforo	Recoge hierro esencial para sobrevivir, fenotipos hipermucoviscosos han sido vinculados a una mayor

INTRODUCCIÓN

	actividad de fijación de hierro
Ureasa	Papel limitado en la precipitación de sales inorgánicas que conducen a la incrustación del catéter
Fimbria tipo I	Involucrado en la formación de comunidades bacterianas intracelulares
Fimbria tipo II	Importante para la formación de <i>biofilms</i> en superficies bióticas y abióticas
Formación de biofilm	Promueve la resistencia a la destrucción del hospedador y a los antimicrobianos, se ha demostrado experimentalmente que se ven facilitados en parte por las fimbrias y las cápsulas
Resistencia antibiótica	La resistencia a carbapenemas limita muchas opciones de tratamiento

3.5 Opciones de tratamientos actuales

El aumento de la resistencia antimicrobiana ha reducido la ventana terapéutica que abarcan los antibióticos. Bajo este escenario, la reintroducción de antibióticos utilizados previamente así como nuevas combinaciones constituyen las nuevas estrategias para tratar las infecciones causadas por cepas multirresistentes (120, 121). A continuación se describe una lista de algunos agentes antimicrobianos utilizados actualmente en el entorno clínico.

3.5.1 Colistina

La colistina, también llamada polimixina E, es un lipopéptido aislado de *Bacillus polymyxa*. El grupo de las polimixinas fue descubierto en la década de 1940, siendo uno de los primeros antibióticos con actividad significativa contra BGN (122). Hay cinco tipos de polimixinas (A-E), pero sólo la polimixina B y E se han utilizado en los seres humanos (123). Sin embargo, en la década de 1970 fueron sustituidos en gran medida por otros antibióticos debido a su nefrotoxicidad y neurotoxicidad (124). Sin embargo, la toxicidad de la colistina fue reevaluada por algunos investigadores, que encontraron que la incidencia de la toxicidad es menos frecuente y grave en comparación con lo que se había informado con anterioridad (125).

La alta prevalencia de infecciones por aislados multirresistentes ha producido que se reconsidere la colistina como una opción terapéutica, lo que ha conllevado a un aumento de su uso (123, 126). La colistina es solamente activa contra BGN multirresistentes, incluyendo *A. baumannii*, *P. aeruginosa* y Enterobacteriales (127, 128).

En cuanto al mecanismo de acción, la colistina tiene una fuerte carga positiva y una cadena de acilo hidrófobo que le proporcionan una alta afinidad de unión a las

INTRODUCCIÓN

moléculas del LPS. La colistina interactúa electrostáticamente con el LPS, desplazando a los cationes divalentes de la molécula, provocando una desorganización de la membrana externa (129), incrementándose la permeabilidad de la envoltura celular y provocando pérdidas del contenido de la célula y, posteriormente, la muerte celular (130).

En este contexto, la resistencia a la colistina ha surgido recientemente en todo el mundo, aunque a niveles relativamente bajos (131). Debido a este hecho, algunos investigadores han concluido que la adquisición de resistencia a la colistina en los pacientes se debe, entre otros, a la propia terapia de colistina y a la transmisión nosocomial de cepas resistentes a este antibiótico (132). Sin embargo, se ha reportado también la aparición *in vivo* de resistencia a la colistina en los seres humanos sin tratamiento previo con colistina o debido a una transmisión clonal (133).

Recientemente, en *E. coli*, se ha descrito el gen *mcr-1*, transportado en un plásmido con alta eficiencia de conjugación, que codifica para una enzima fosfoetanolamina transferasa que cataliza un cambio que confiere resistencia a colistina (59). Además, este gen y sus variantes se han detectado en los aislados recuperados de la veterinaria en todo el mundo y de pacientes humanos (134-136). Esto implica que la evolución de la resistencia a la colistina en bacterias podría ser más compleja de lo que se pensaba hasta ahora.

3.5.2 Ceftolozano/tazobactam

Uno de los tratamientos más recientes es la combinación de ceftolozano/tazobactam que fue aprobada por la FDA en 2014 y tiene indicaciones para el tratamiento de infecciones intraabdominales en combinación con metronidazol y para infecciones complicadas del tracto urinario. La combinación contiene una nueva cefalosporina, el ceftolozano, combinada con el inhibidor de la β -lactamasa tazobactam.

Ceftolozano es estructuralmente similar a la cefalosporina de tercera generación ceftazidima, pero con una cadena lateral modificada que confiere una mayor actividad contra *P. aeruginosa* a través de una mayor resistencia a la hidrólisis y el flujo de salida. El tazobactam, que tiene décadas de uso como parte de la combinación del inhibidor de la β -lactámico/inhibidor de β -lactamasa piperacilina/tazobactam, restaura la actividad del ceftolozano en presencia de la mayoría de las clases β -lactamasas de clase A y algunas de clase C, y fue más potente que inhibidores de β -lactamasa como sulbactam o

INTRODUCCIÓN

clavulanato para reducir la actividad enzimática en un 50% contra TEM-1, CTX-M-14 o CTX M-15 (137).

El ceftolozano/tazobactam ha demostrado una actividad consistentemente potente contra *P. aeruginosa* en estudios *in vitro*, incluso contra aislados altamente resistentes a otras β -lactamasas. En una población altamente resistente de aislamientos de *P. aeruginosa* (39,1% multirresistentes, 11,6% sensible solo a la colistina) de 31 centros médicos en 13 países europeos, el ceftolozano/tazobactam fue el agente más activo de los que se probaron, inhibiendo el 84,5% de los aislamientos con una CMI \leq 4-8 mg/L (137).

En un estudio con aislados procedentes de un estudio de vigilancia de bacteriemia en Reino Unido, se mostró que el ceftolozano/tazobactam es activo contra el 91,5%-99,7% de las principales especies de *Enterobacteriales*. Esta actividad incluyó el 97,9% de las *E. coli* productoras de BLEE, pero solo el 84%-85% de las cepas de *Klebsiella* y especies de *Enterobacter* (138). Sin embargo, la combinación ceftolozano/tazobactam no ofreció ganancia en actividad en comparación con cefalosporinas de anteriores generaciones contra especies de *Acinetobacter* (138).

3.5.3 Ceftazidima/avibactam

La combinación ceftazidima/avibactam fue aprobada por la FDA en 2015 con indicaciones para el tratamiento de infecciones intraabdominales en combinación con metronidazol y para infecciones complicadas del tracto urinario. La combinación contiene la cefalosporina tercera generación ceftazidima junto con el nuevo inhibidor de β -lactamasa no β -lactámico avibactam. La ceftazidima tiene actividad contra muchos BGN clínicamente relevantes, como *P. aeruginosa*; sin embargo, es fácilmente hidrolizado por una variedad de β -lactamasas, lo que limita su eficacia contra patógenos multirresistentes. Avibactam carece de actividad antibacteriana clínicamente significativa; sin embargo, inhibe un amplio espectro de β -lactamasas, con alta afinidad por las enzimas de clase A, C y algunas D, restaurando así la actividad *in vitro* de ceftazidima (137).

Ceftazidima/avibactam es activo contra la mayoría de aislados de *P. aeruginosa*, incluyendo algunas cepas multirresistentes. De 3.902 aislados de *P. aeruginosa* en 75 centros médicos de Estados Unidos, el 96,9% fueron susceptibles a ceftazidima/avibactam, más alto que las tasas observadas para la ceftazidima sola, la piperacilina/tazobactam o el meropenem; 83,8%, 78,5% y 81,9%, respectivamente (137).

INTRODUCCIÓN

En cuanto a *Acinetobacter*, a pesar de la adición de avibactam, la especie se mantiene resistente a la combinación, probablemente debido a la falta de actividad frente a las betalactamasas tipo OXA (distintas de OXA-48) y a la suma de múltiples mecanismos de resistencia que logra albergar este género. Por todo ello, ceftazidima/avibactam no se encuentra aprobado por la FDA para el tratamiento de infecciones por especies de *Acinetobacter* (139). Por el contrario, en un estudio con cepas procedentes de 94 hospitales de Estados Unidos, la combinación ceftazidima/avibactam inhibió al 99,9% de aislados de especies de *Enterobacteriales*, entre las que se encontraban aislados multirresistentes de *E. coli* y *K. pneumoniae* (140).

4. Nuevas terapias para tratar las infecciones por BGN

La resistencia a los antibióticos es un problema clínico de enorme magnitud que se ve agravado por la falta de nuevos agentes terapéuticos. La retirada del sector farmacéutico del nuevo desarrollo de antibióticos ha agudizado el desafío de la resistencia generalizada y señala una necesidad crítica de innovación, como bien pueden ser los enfoques no antimicrobianos. Todas estas razones han hecho necesaria la búsqueda urgente de nuevas alternativas para el tratamiento y control de las infecciones causadas por BGN. Aproximaciones no bactericidas pero que puedan evitar la infección producida por estos patógenos, ya sean bloquear los factores de virulencia bacterianos o mediante la inmunización del huésped, podrían ser enfoques adyuvantes que logren alcanzar nuevos objetivos terapéuticos. Otro de estos enfoques podría ser el de aumentar la actividad antibiótica en las infecciones por BGN multirresistentes mediante la administración de antibióticos junto con compuestos adyuvantes no antibióticos, que podrían ser fármacos reposicionados para nuevo uso (114).

4.1 Compuestos o inhibidores anti-virulencia

El creciente estudio sobre la patogénesis bacteriana y la comunicación intercelular ha revelado muchas estrategias potenciales para desarrollar nuevos fármacos con el objetivo de tratar las enfermedades causadas por bacterias. La interferencia con la virulencia bacteriana y las vías de señalización celular es un enfoque especialmente convincente, ya que se piensa que se aplica una presión menos selectiva para el desarrollo de resistencia bacteriana que las estrategias tradicionales, que tienen como objetivo eliminar bacterias o prevenir su crecimiento (141).

INTRODUCCIÓN

Las bacterias perciben su entorno y, una vez en el huésped, responden iniciando un programa definido para activar factores de virulencia (141, 142). Estrategias de señalización anti-virulencia pueden interferir específicamente con la capacidad de la bacteria para reconocer las señales del huésped que alertan a estas bacterias que están en el sitio de la infección y activar factores específicos de virulencia que se necesitan para establecer dicha infección. Por este motivo, al prevenir la expresión o actividad de estos factores de virulencia, las bacterias son menos capaces de colonizar al huésped. Se cree que esta inhibición podría permitir que el sistema inmune del huésped, incluida la microbiota, pueda llegar a evitar la colonización bacteriana o aclarar cualquier infección establecida. Además, estas aproximaciones anti-virulencia podrían usarse potencialmente en combinación con antimicrobianos establecidos o novedosos de manera sinérgica para potenciar la vida útil de estas drogas (141, 143).

4.1.1. Inhibidores de *quorum sensing*

Muchas bacterias emplean alguna forma de comunicación intercelular para alertar a los patógenos sobre su concentración bacteriana colectiva. Si se detectan altas concentraciones, los patógenos pueden cambiar sus perfiles de transcripción a un fenotipo más invasivo. Una gran variedad de moléculas naturales y sintéticas puede bloquear la detección del QS y mejorar los resultados en modelos experimentales de infección sistémica. Actualmente, ante la pregunta de si los inhibidores de la detección de QS tendrán un beneficio clínico práctico contra los patógenos multirresistentes, la respuesta sigue siendo objeto de debate científico (144, 145). Se ha demostrado en estudios recientes que extractos de *Bacillus indicus*, *B. pumilus* y otras especies de *Bacillus*, como el SS4, causó una inhibición significativa de las actividades basadas en QS en bacterias gramnegativas, como *P. aeruginosa*, *S. marcescens* y especies de *Vibrio*. Otro trabajo demostró que el extracto D11 (DL-homocisteína tiolactona) fue capaz de inhibir los sistemas de regulación lasR y rhIR de *P. aeruginosa* (144).

4.1.2. Inhibidores de la adhesión bacteriana

Muchas bacterias, como *E. coli* uropatógena, usan una estructura de unión conocida como pilus para adherirse a la célula del huésped. Se ha demostrado que el tratamiento con pilicidas disminuye la eficacia de la colonización de aislados de este patógeno en el tracto urinario. Los pilicidas son miméticos de las subunidades de pilina que, cuando se incorporan a esta estructura, evitan la elongación y la formación de un pilus funcional.

INTRODUCCIÓN

También se han identificado pequeñas moléculas inhibidoras de la biogénesis del pilus, que pertenecen a la clase de 2-piridonas bicíclicas. Sin embargo, estos inhibidores de la adhesión encuentran una dificultad que radica en las fuerzas físicas encontradas en las membranas mucosas a las que se unen muchos patógenos (141, 146).

Un gran número de patógenos bacterianos usan sus proteínas de membrana externa para interactuar con el entorno del huésped a fin de inducir la expresión de factores de virulencia, invadir tejidos y escapar del sistema inmune. Estos patógenos parecen usar la OmpA, entre otros, para unirse a las células del huésped y para mediar la entrada de la bacteria. En este contexto, el desarrollo de un inhibidor de esta proteína AOA-2 fue capaz de producir una inhibición de la adherencia de BGN como *A. baumannii*, *P. aeruginosa* y *E. coli*, a las células del huésped y, en consecuencia, un aumento en la viabilidad celular. Al mismo tiempo, este péptido mostró una potente actividad inhibidora sobre la formación de *biofilm*. La administración *in vivo* de dicho compuesto también mostró una gran disminución en la carga bacteriana en bazo y pulmones junto con una disminución significativa en la mortalidad de ratones, especialmente en *A. baumannii* (147).

4.1.3. Inhibidores de los sistemas de secreción

Aunque hay muchos tipos diferentes de sistemas de secreción, hay un número limitado de formas de inhibirlos. Los inhibidores pueden evitar el ensamblaje del propio sistema, inhibir la interacción con el huésped eucariótico o inhibir la secreción de los efectores del sistema (141).

La mayoría de BGN libera toxinas a través de su sistema de secreción tipo III, un complejo multiproteico. Los inhibidores de este sistema pueden ser activos contra múltiples bacterias diferentes. Por ejemplo, el compuesto KB001 (KaloBios), fue seguro y mostró una tendencia a disminuir el desarrollo de NAVM en pacientes colonizados por *P. aeruginosa*. En este contexto, también se ha desarrollado el compuesto MEDI3902, un anticuerpo monoclonal biespecífico quimérico que reconoce tanto el PcrV, componente crucial del sistema de secreción tipo III, como el polisacárido Psl, localizado en la superficie de *P. aeruginosa* (148).

4.1.4. Terapia de fagos

El uso de bacteriófagos, virus que lisan bacterias específicas, como un reemplazo de los agentes antimicrobianos contra los patógenos multirresistentes continúa siendo una

INTRODUCCIÓN

opción atractiva a pesar del desafío que supone (145, 149, 150). La terapia con fagos vuelve a ganar gran interés debido a que la resistencia a los antimicrobianos supone ya una realidad como crisis global en salud. La bacteriólisis por fagos líticos seleccionados se ha comparado con la actividad de un antibiótico rápidamente bactericida contra bacterias susceptibles. Los fagos invaden las bacterias a través de la fijación a receptores de su superficie, donde se replican intracelularmente y matan al huésped bacteriano al digerir el peptidoglicano de la pared celular. Los fagos se encuentran en la naturaleza de forma abundante y en nuestra dieta son ingeridos millones de ellos diariamente de forma inofensiva (150). La terapia de fagos se puede administrar por vía tópica en heridas abiertas o infecciones superficiales, o por vía intravenosa para uso en infecciones sistémicas (149). El hecho de que los bacteriófagos puedan tener una eficacia mejorada en comparación con los antibióticos proporciona mayor esperanza para el futuro. Smith y coautores demostraron por primera vez este hallazgo a principios de la década de los 80, cuando indujeron una infección letal por *E. coli* en ratones utilizando una cepa altamente virulenta que expresaba una cápsula de polisacárido K1. Una sola dosis intramuscular de fago anti-K1 fue tan efectiva como las inyecciones múltiples de estreptomicina, y fue superior a las dosis intramusculares múltiples de tetraciclina, ampicilina, cloranfenicol o trimetoprim en la curación de los animales (150). Además de estudios *in vivo*, también se ha llevado a cabo un ensayo clínico con el fin de evaluar la eficacia y seguridad de una preparación terapéutica de bacteriófagos (Biophage-PA) dirigida contra *P. aeruginosa* resistente a diferentes antibióticos en la otitis crónica, donde se incluyeron 24 pacientes. La variación con respecto a los niveles de referencia fue estadísticamente significativa para la mayoría de los pacientes que evaluaron los indicadores clínicos solo para el grupo tratado con fagos. Los recuentos de *P. aeruginosa* fueron significativamente más bajos solo en el grupo tratado con fagos. Además, no se informaron eventos adversos relacionados con el tratamiento (149).

4.2. Moléculas con acción sobre el sistema inmune

4.2.1 Lisofosfatidilcolina

El éxito de la terapia antimicrobiana depende de una respuesta inmune apropiada, por lo que se ha propuesto la estimulación inmune como un posible enfoque adyuvante junto con la terapia antibiótica (151). En este escenario, la lisofosfatidilcolina es un componente principal de los fosfolípidos en las células eucarióticas. Está implicado en

INTRODUCCIÓN

el reclutamiento y la modulación de células inmunes como monocitos, fagocitos y linfocitos T (152). Se ha descrito que la lisofosfatidilcolina aumentó la supervivencia en ratones tras una ligación cecal y la punción o inyección intraperitoneal de *E. coli* (153), y después del desarrollo de la sepsis peritoneal por *A. baumannii*. Este compuesto tanto en monoterapia como en terapia combinada con colistina, tigeciclina e imipenem mejora notablemente el aclaramiento bacteriano del bazo y el pulmón y reduce la bacteriemia, presumiblemente debido a la modulación de la respuesta inmune (154, 155).

4.2.2 Péptidos antimicrobianos

Otros enfoques para modular el sistema inmune son el uso de péptidos pequeños para controlar las infecciones causadas por BGN.

Por ejemplo, las secreciones de la piel de muchas especies de *Anura* (ranas y sapos) contienen péptidos citotóxicos que son una parte importante de la respuesta inmune innata y proporcionan la primera línea de defensa contra la invasión de patógenos microbianos (156). Estos péptidos son multifuncionales, poseen propiedades inmunomoduladoras y quimioatrayentes así como actividad citotóxica (157). Entre estos péptidos de defensa del huésped, que son componentes conservados evolutivamente del sistema inmune innato entre la mayoría de los organismos multicelulares, podemos encontrar la himenquirina-1B, la apolipoproteína E (apoE) y el esculentin-2CHa.

En el caso de los péptidos del sistema inmune innato humano, las beta-defensinas hBD-2, hBD-3 y hBD-4 han presentado actividades bactericidas contra cepas multirresistentes de *A. baumannii* y *P. aeruginosa* (158, 159). LL-37, un péptido catiónico de la familia de las catelecidinas, mostró una actividad antimicrobiana significativa contra las cepas de *A. baumannii* resistentes a colistina y multirresistentes, evitando además la formación de *biofilm*, lo que añade importancia a su eficacia (160).

4.3. “Repurposing”: reposicionamiento de fármacos

El descubrimiento de fármacos antimicrobianos clásicos, aunque continúa siendo necesario, implica grandes gastos en tiempo y recursos. Esto, junto con la ventana relativamente corta de aplicación terapéutica atribuida a la rápida aparición de resistencia a estos medicamentos, ha provocado en los últimos años un interés cada vez menor en la generación de nuevos antibióticos entre las empresas farmacéuticas. En este entorno, el reposicionamiento de fármacos, entendido como una nueva aproximación terapéutica de un fármaco utilizado originalmente para otro uso clínico, ha ganado un

INTRODUCCIÓN

interés renovado y puede ayudar a acelerar el proceso de desarrollo de medicamentos y ahorrar años de costosas investigaciones invertidas en el desarrollo de medicamentos antimicrobianos.

En este escenario, existen prometedoras aproximaciones tanto *in vitro* como *in vivo* de diferentes fármacos candidatos a ser reposicionados como agentes antimicrobianos. Estos compuestos se pueden clasificar dentro de una variedad de familias de fármacos, como son los antihelmínticos (161, 162), los anticancerígenos (163), los antiinflamatorios/inmunomoduladores (164), los antipsicóticos y antidepresivos (165), las estatinas (166), los fármacos implicados en el almacenamiento de hierro (167), entre otras.

4.3.1 Los antihelmínticos

Los fármacos antihelmínticos constituyen una familia de compuestos utilizados para el tratamiento de la helmintiasis. Su actividad, además del tratamiento de la infección por parásitos, está siendo investigada en otros campos de la biomedicina como la oncología. Existen estudios acerca de estos medicamentos sobre su actividad en BGN. Dentro de la familia de las salicilanilidas, se encuentra la niclosamida, utilizada en humanos (168) y la oxiclozanida, rafoxanida y el closantel, usados en veterinaria (169). El modo de acción de las salicilanilidas no se conoce por completo, pero se cree que actúa a nivel de la fosforilación oxidativa, provocando una alteración de la motilidad de los parásitos. Este grupo de fármacos, siendo la niclosamida el más estudiado, ha demostrado actividad frente a *P. aeruginosa*, inhibiendo el QS y genes de virulencia, frente a *A. baumannii* y *K. pneumoniae*, potenciando el efecto de la colistina, así como contra *Helicobacter pylori* (170, 171).

4.3.2 Los anticancerígenos

Los fármacos anticancerígenos han mostrado también actividad antibacteriana. Por ejemplo, el toremifeno, un antagonista selectivo de los receptores estrogénicos usado para el tratamiento del cáncer de mama, ha presentado eficacia contra la infección oral causada por *Porphyromonas gingivalis* (172). Se ha podido demostrar que este fármaco es capaz de permeabilizar rápidamente las membranas externa e interna de *P. gingivalis*. Además, se demostró que el toremifeno es capaz de interactuar con el LPS de la membrana externa de *P. gingivalis*, lo que confirmó aún más la interacción directa del toremifeno con las membranas bacterianas. También pudo visualizarse

INTRODUCCIÓN

microscópicamente los cambios en la integridad de la membrana bacteriana. Por otro lado, el 5-fluorouracilo, un potente anticancerígeno indicado para el tratamiento de diferentes tipos de tumores sólidos, y el nitrato de galio, un fármaco anticanceroso para el tratamiento del linfoma y el cáncer de vejiga, también presentaron actividad antibacteriana tanto *in vitro* como *in vivo* contra *P. aeruginosa* y *A. baumannii*, respectivamente (173, 174). Se encontró que, debido a que la biosíntesis de uracilo es importante para el QS, tenía efecto sobre la formación de *biofilm* y la producción de factores de virulencia controlados por este QS. En este escenario, el 5-fluorouracilo actúa como un represor efectivo de QS y *biofilm* sin tener un efecto inhibitorio severo sobre el crecimiento y fue capaz de proteger contra la infección por *P. aeruginosa* (174). En cuanto al nitrato de galio, se demostró que este fue capaz de interferir en el metabolismo del hierro de *A. baumannii*. Este compuesto no solo fue efectivo para inhibir el crecimiento bacteriano *in vitro*, sino que también brindó una poderosa protección contra la infección por *A. baumannii in vivo*. Los experimentos en el modelo de *Galleria mellonella* demostraron que también es activo en la prevención de la infección letal por diferentes cepas de *A. baumannii* (173).

4.3.3 Los antiinflamatorios e inmunomoduladores

Varios medicamentos antiinflamatorios e inmunomoduladores presentaron actividad frente a BGN. El celecoxib, el diclofenaco y la betametasona mostraron eficacia *in vitro* contra *A. baumannii*, *P. aeruginosa*, *E. coli*, *K. pneumoniae* y *Salmonella*, respectivamente, tanto en monoterapia como en combinación con antibióticos (175, 176). Otro fármaco, el acetato de glatiramer, utilizado para el tratamiento de la esclerosis múltiple, también presentó actividad *in vitro* contra *A. baumannii*, *P. aeruginosa* y *E. coli* (177). Mediante citometría de flujo, este compuesto demostró tener una actividad antibacteriana rápida y eficaz contra estos patógenos. Esta eficacia fue demostrada en cepas clínicas de *A. baumannii* y *E. coli* y en el 50% de aislamientos clínicos de *P. aeruginosa* de infección crónica de las vías respiratorias en pacientes con fibrosis quística (177).

4.3.4 Los antipsicóticos y antidepresivos

Los fármacos antipsicóticos y antidepresivos también se han evaluado como fármacos con potencial actividad antibacteriana. La pimozida, utilizada para el tratamiento del síndrome de Tourette severo y la esquizofrenia, mostró actividad *in vitro* frente a

INTRODUCCIÓN

infecciones por *Salmonella* y *E. coli* (178). También la trifluoperazina, un fármaco antipsicótico, ha presentado actividad contra *Yersinia pestis* (163). Además, se ha demostrado que la amoxapina, un medicamento antidepresivo, también presentaba eficacia contra *Y. pestis* y *K. pneumoniae* (163, 180).

4.3.5 Otros fármacos

En el grupo de las estatinas, encontramos la simvastatina, utilizada en el tratamiento de la enfermedad cardiovascular aterosclerótica y en la hipercolesterolemia, que mostró actividad antibacteriana en combinación con concentraciones subinhibitorias de colistina frente a un grupo de BGN que incluía *A. baumannii*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* and *S. typhimurium*, con un rango de CMI entre 8 y 32 µg/mL (166, 180). Además, otros fármacos como el ácido pentético, un quelante de hierro, y el calcitriol, la forma bioactiva de la vitamina D3, usada para tratar condiciones de hipocalcemia y osteodistrofia renal, se han estudiado como posibles fármacos antivirulencia contra *P. aeruginosa* (167, 181). En las células de la cepa PAO1 de *P. aeruginosa* tratadas con ácido pentético, la transcripción del gen *lasB* que codifica para la elastasa y los niveles de las moléculas de señalización que median la detección del QS, se redujeron significativamente. Además, la formación de *biofilm* también disminuyó con el tratamiento de ácido pentético en este patógeno (167).

En resumen, existe una gran batería de fármacos candidatos a ser reposicionados como compuestos con actividad antibacteriana; algunos de ellos solo han mostrado dicha capacidad en experimentos *in vitro*, por lo que sería necesario estudios acerca de su eficacia terapéutica en modelos de infección *in vivo*, tanto invertebrados, por ejemplo larvas de *G. mellonella* o animales vertebrados, como los ratones. Aquellos fármacos que ya han demostrado eficacia en modelos *in vivo* son candidatos prometedores, de los que también sería necesario investigar acerca de su mecanismo de acción (Figura 7), ya sea en la propia bacteria o en el huésped.

INTRODUCCIÓN

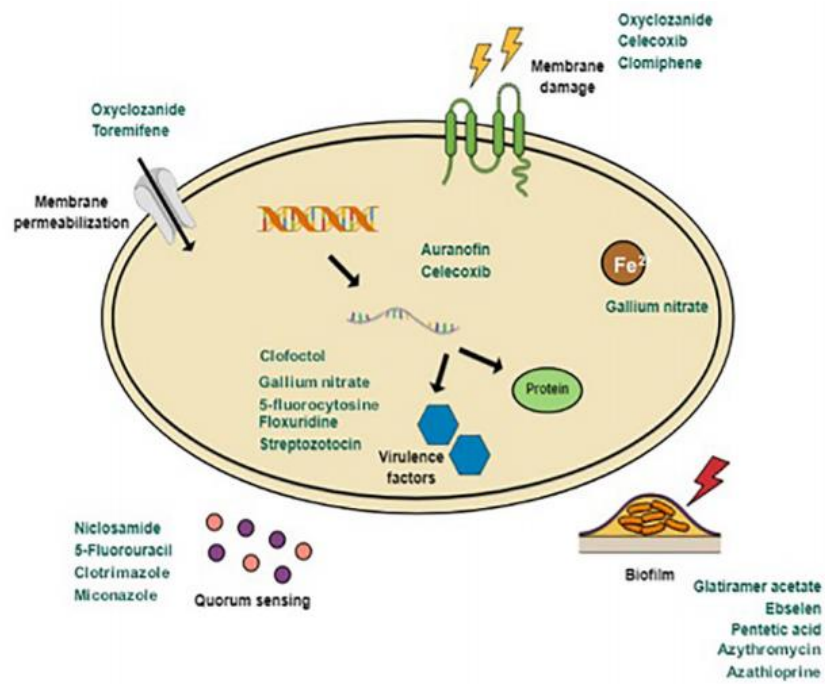


Figura 7. Mecanismos de acción de algunos fármacos reposicionados como compuestos antibacterianos.

II. FUNDAMENTOS

FUNDAMENTOS

Muchas organizaciones están de acuerdo en que la aparición e incremento de infecciones por BGN multirresistentes se trata de una amenaza para la salud mundial que necesita soluciones y planes eficaces de manera urgente. La alta tasa de cepas resistentes a la mayoría o a todos los antibióticos utilizados en la práctica clínica está causando infecciones difíciles de tratar, y este problema está directamente asociado a tasas de mortalidad nada despreciables. En este escenario, otro factor negativo que agrava la situación es la falta de desarrollo de otras opciones terapéuticas para el tratamiento de estas infecciones. Por esta razón, existe una evidente necesidad de ahondar en el reto de desarrollar nuevos medicamentos o estrategias para combatir a los BGN multirresistentes y panresistentes. En este contexto, el estudio y la investigación para el desarrollo de alternativas terapéuticas no antimicrobianas, así como el reposicionamiento de fármacos con otro uso terapéutico, son dos de los enfoques científicos más prometedores.

Así pues, se consideran como una nueva estrategia alentadora aquellas terapias dirigidas contra patógenos que bloquean los factores de virulencia bacteriana sin inhibir su crecimiento, siendo esto un factor importante ya que existe de esta forma una menor presión selectiva para la generación de resistencia. Ya se ha demostrado en un trabajo de nuestro grupo de investigación la eficacia de un péptido, AOA-2, inhibidor de la OmpA, tanto *in vitro*, reduciendo la capacidad infectiva de BGN contra el huésped, como *in vivo*, en modelos experimentales murinos de infección (147). Por tanto, resulta de interés la optimización de esta molécula, con el fin de generar una nueva librería de derivados que mejoren la actividad mostrada por el compuesto inicial.

Por otro lado, una alternativa a las estrategias antimicrobianas también sería el reposicionamiento o “*repurposing*” de fármacos ya desarrollados y aprobados por la FDA. Estos medicamentos, aunque tienen una indicación para otro tipo de enfermedades, constituyen una librería de compuestos con un potencial de presentar actividad contra bacterias. Además, esto supone una gran ventaja en el esfuerzo económico que supone sacar un nuevo compuesto al mercado. En este contexto, los antihelmínticos, usados para el tratamiento de helmintos y lombrices tanto en humanos como en veterinaria, han mostrado un potencial efecto frente a diversos patógenos (168, 170, 171). Así, estos compuestos, usados como adyuvantes al tratamiento antibiótico, pueden ser una aproximación terapéutica muy interesante.

III. HIPÓTESIS

HIPÓTESIS

Las hipótesis de esta tesis doctoral son las siguientes:

Capítulo I.

1. El hexapéptido AOA-2 se une a OmpA con alta afinidad y selectividad.
2. El inhibidor de OmpA AOA-2 no tiene efectos sobre la respuesta inmune, innata y adaptativa.
3. La optimización del hexapéptido AOA-2 y sus derivados mejora sus actividades inhibitorias de OmpA en modelos *in vitro* de infección por *A. baumannii*, *P. aeruginosa* y *E. coli*.

Capítulo II.

A. Niclosamida

1. La niclosamida presenta una actividad sinérgica en combinación con colistina frente a cepas de *A. baumannii* y *K. pneumoniae* sensibles y resistentes a colistina.
2. La niclosamida tiene un efecto sobre las cargas eléctricas de la membrana bacteriana frente a cepas de *A. baumannii* y *K. pneumoniae* sensibles y resistentes a colistina.

B. Oxiclozanida

1. La oxiclozanida presenta una actividad sinérgica en combinación con colistina frente a cepas de *A. baumannii*, *P. aeruginosa* y *K. pneumoniae* sensibles y resistentes a colistina.
2. La oxiclozanida tiene un efecto disruptivo sobre la membrana bacteriana frente a cepas de *A. baumannii*, *P. aeruginosa* y *K. pneumoniae* sensibles y resistentes a colistina.

IV. OBJETIVOS

OBJETIVOS

El **objetivo general** de esta Tesis Doctoral es contribuir en el conocimiento sobre el desarrollo y evaluación del uso de fármacos no antimicrobianos como adyuvante al tratamiento antibiótico para las infecciones por BGN multirresistentes. Los objetivos específicos de cada capítulo son los que se describen a continuación:

Objetivos del capítulo I

1. Estudiar el mecanismo de inhibición de OmpA por el péptido AOA-2.
2. Estudiar el efecto del AOA-2 sobre la respuesta inmune innata y adaptativa.
3. Modificar la estructura química del hexapéptido AOA-2 para la síntesis de sus derivados optimizados.
4. Estudiar la toxicidad *in vitro* e *in vivo* de los derivados optimizados.
5. Evaluar las actividades inhibitorias de los derivados de AOA-2 sobre OmpA de *A. baumannii*, *P. aeruginosa*, y *E. coli*.

Objetivos del capítulo II

A. Niclosamida

1. Estudiar *in vitro* el efecto sinérgico de la niclosamida en combinación con colistina frente a cepas de *A. baumannii* y *K. pneumoniae* sensibles y resistentes a colistina.
2. Determinar el mecanismo de acción de la niclosamida sobre las cepas de *A. baumannii* y *K. pneumoniae* sensibles y resistentes a colistina.

B. Oxiclozanida

1. Estudiar *in vitro* el efecto sinérgico de la oxiclozanida en combinación con colistina frente a cepas de *A. baumannii*, *P. aeruginosa* y *K. pneumoniae* sensibles y resistentes a colistina.
2. Analizar *in vitro* el efecto de la oxiclozanida sobre el perfil de las proteínas de la membrana externa de cepas de *A. baumannii*, *P. aeruginosa* y *K. pneumoniae* sensibles y resistentes a colistina.
3. Determinar el mecanismo de acción de la oxiclozanida en cepas de *A. baumannii*, *P. aeruginosa* y *K. pneumoniae* sensibles y resistentes a colistina.

V. RESULTADOS

1. CAPÍTULO I

CAPÍTULO I. Artículo 1

1.1. Artículo 1. *Combating virulence of Gram-negative bacilli by OmpA inhibition.*

La OmpA y las proteínas homólogas son un principal factor de virulencia de BGN tales como *A. baumannii*, *P. aeruginosa* y *E. coli*. Esta OmpA está implicada en la adherencia de estos BGN a superficies bióticas y abióticas, así como en la muerte *in vitro* e *in vivo* de las células del huésped. En este contexto, la OmpA constituye una diana idónea para el desarrollo de péptidos con el fin terapéutico del tratamiento de infecciones causadas por estos BGN. En este estudio, se tuvo como objetivo evaluar la actividad *in vitro* e *in vivo* de un inhibidor de la OmpA en la infección por BGN, así como su mecanismo.

En colaboración con el equipo del Dr. Ernest Giralt, se diseñaron *in silico* y se sintetizaron seis inhibidores de OmpA positivos y un péptido control negativo. Una vez evaluada la librería peptídica, el AOA-2, el mejor candidato, fue elegido para los estudios posteriores. La afinidad y selectividad de AOA-2 a OmpA fue estudiada mediante ensayos de resonancia magnética STD (*Saturation transfer difference*) y ensayos de difusión por resonancia magnética. El efecto *in vitro* de la interacción de AOA-2 entre las cepas *A. baumannii* ATCC 17978, *P. aeruginosa* PAO1, *E. coli* ATCC 25922, y las células epiteliales de pulmón humano (A549) se caracterizó mediante ensayo de adherencia, inmunofluorescencia, de unión a fibronectina, y con un ensayo de viabilidad celular. Además, AOA-2 presentó un efecto sobre la formación de *biofilm* en una colección de cepas estándar y clínicas de *A. baumannii*, *P. aeruginosa* y *E. coli*. En un modelo de sepsis peritoneal murino, se evaluó la eficacia terapéutica de AOA-2, 10 mg/kg/día por vía intraperitoneal, contra estos patógenos y se determinó la carga bacteriana en bazo y pulmones, así como la bacteriemia y la supervivencia animal.

Los ensayos de resonancia magnética STD mostraron que a 8 μ M de OmpA, las señales STD obtenidas con -0,75 y -0,5 ppm permitieron sugerir la interacción entre el AOA-2 y el sistema compuesto por OmpA-Triton-X100. Además, se observó una pequeña reducción en la difusión por RM en presencia de OmpA, y una señal detectable de ampliación y una pequeña desviación cuando OmpA fue añadida a AOA-2, lo que sugiere la presencia de una interacción entre OmpA y AOA-2. Por otra parte, se observó una reducción significativa de la adherencia bacteriana a las células A549 y la unión a la fibronectina después tras la incubación de las cepas ATCC 17978, PAO1 y ATCC 25922 con 0,25 y 0,5 mg/ml de AOA-2, así como la protección de estas células epiteliales de la muerte causada por las cepas ATCC 17978 y PAO1. El péptido AOA-2

CAPÍTULO I. Artículo 1

redujo significativamente la formación de biofilms por las cepas de los tres patógenos. Por otra parte, en el modelo de sepsis peritoneal, el tratamiento con AOA-2 redujo tanto la carga bacteriana para ATCC 17978 en bazo y pulmones como el cultivo de sangre positivo, y se produjo un 70% de aumento de la supervivencia animal. Para las cepas PAO1 y ATCC 25922, el tratamiento con AOA-2 también redujo la carga bacteriana en bazo y pulmones y el cultivo de sangre positivo, traduciéndose en un aumento del 40% sobre la supervivencia animal. Estos datos indican que la inhibición con alta afinidad de la OmpA por AOA-2 podría proteger contra las infecciones por BGN.

Una parte de los resultados de este artículo ya ha sido presentada con anterioridad, y corresponden a la tesis doctoral de la Dra. Raquel Parra Millán, mientras que la otra parte, concretamente el estudio del mecanismo de inhibición de AOA-2, pertenece a esta tesis doctoral.

SCIENTIFIC REPORTS

OPEN

Combating virulence of Gram-negative bacilli by OmpA inhibition

Xavier Vila-Farrés^{1,3}, Raquel Parra-Millán², Viviana Sánchez-Encinales², Monica Varese¹, Rafael Ayerbe-Algaba², Nuria Bayó¹, Salvador Guardiola¹, María Eugenia Pachón-Ibáñez², Martín Kotev¹, Jesús García¹, Meritxell Teixidó¹, Jordi Vila³, Jerónimo Pachón², Ernest Giral^{1,4} & Younes Smani²

Received: 10 April 2017

Accepted: 19 October 2017

Published online: 31 October 2017

Preventing the adhesion of pathogens to host cells provides an innovative approach to tackling multidrug-resistant bacteria. In this regard, the identification of outer membrane protein A (OmpA) as a key bacterial virulence factor has been a major breakthrough. The use of virtual screening helped us to identify a cyclic hexapeptide AOA-2 that inhibits the adhesion of *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli* to host cells and the formation of biofilm, thereby preventing the development of infection *in vitro* and in a murine sepsis peritoneal model. Inhibition of OmpA offers a strategy as monotherapy to address the urgent need for treatments for infections caused by Gram-negative bacilli.

Treatment of bacterial infections, especially those caused by strains resistant to all known antibiotics, is a major concern. The number of antibiotics approved by the FDA cannot keep pace with the rapid development of antimicrobial resistance. There is, therefore, an urgent need to find new antibiotics against extensive- (XDR) and pandrug-resistant (PDR) Gram-negative bacilli (GNB)¹. Majority of the antibiotics currently in use are either bactericidal or bacteriostatic and most work against a broad spectrum of bacteria. Two key approaches can help alleviate the problem of antibiotic resistance, first the development of single-pathogen therapies focused on the specific treatment of infections caused by a single pathogen highly resistant to antimicrobial agents², and second targeting bacterial virulence factors without inhibiting bacterial growth, which can slow the development of drug resistance by reducing the selective pressure on the bacteria^{3,4}.

Many bacterial pathogens use their outer membrane proteins (OMPs) to interact with the host environment in order to induce the expression of virulence factors, to invade tissues, and to escape the immune system^{4–6}. These pathogens appear to use the outer membrane protein A (OmpA), among others, to attach to host cells and to mediate bacterial entry⁷. OmpA is a beta-barrel porin that is highly conserved among bacterial species, especially throughout GNB⁷. This protein is multifunctional, with a variety of *in vitro* and *in vivo* biological properties of interest. It has been shown to be involved in adherence to epithelial cells^{8–10}, translocation into epithelial cells nucleus¹¹, induction of epithelial cell death and mouse mortality^{12–14}, biofilm formation^{9,15}, and binding to factor H postulated to allow bacteria to develop serum-resistance^{15–18}. In humans this protein has been recently associated with the development of pneumonia and bacteremia by a GNB, *Acinetobacter baumannii*¹⁴.

Given the prominence of OmpA in promoting the GNB virulence, we designed a series of OmpA inhibitors and tested their effectiveness *in vitro* and *in vivo* in preventing infection by the most prevalent GNB in clinical settings as *A. baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli*.

Results & Discussion

Peptide design and synthesis. OmpA of *E. coli* is the best-characterized member of a large family of homologous bacterial proteins. The three-dimensional structure of the two independently folded domains of *E. coli* OmpA has been determined by X-ray and NMR. The 170 N-terminal residues form an eight-stranded β -barrel that is embedded in the outer membrane^{19–22}. The globular structure of the periplasmic C-terminal part belongs to the OmpA-like domain-fold family²³.

¹Institute for Research in Biomedicine (IRB Barcelona), Barcelona Institute for Science and Technology (BIST), Barcelona, Spain. ²Institute of Biomedicine of Seville (IBiS), University Hospital Virgen del Rocío/CSIC/University of Seville, Seville, Spain. ³Barcelona Centre for International Health Research (CRESIB, Hospital Clínic-Universitat de Barcelona), Barcelona, Spain. ⁴Faculty of Chemistry, University of Barcelona, Barcelona, Spain. Xavier Vila-Farrés and Raquel Parra-Millán contributed equally to this work. Correspondence and requests for materials should be addressed to J.P. (email: pachon@us.es) or Y.S. (email: ysmani-ibis@us.es)

CAPÍTULO I. Artículo 1

www.nature.com/scientificreports/

Cyclic peptide	Docking score
&Arg-D-Pro-Trp-Arg-D-Pro-Trp&	−10.8
&Trp-D-Pro-Arg-Trp-D-Pro-Arg&	−10.6
&Arg-Pro-Trp-Arg-Pro-Trp&	−10.3
&Trp-Pro-Arg-Trp-Pro-Arg&	−10.0
&Trp-Pro-D-Arg-Trp-Pro-D-Arg&	−9.2
&Arg-Pro-D-Trp-Arg-Pro-D-Trp&	−8.9
&Arg-D-Pro-D-Ile-Arg-D-Pro-D-Ile&	−8.5
&Trp-D-Pro-Arg-Trp-D-Pro-Arg&	−8.5
&Arg-D-Pro-Ile-Arg-D-Pro-Ile&	−8.2
&Ser-D-Pro-Trp-Ser-D-Pro-Trp&	−7.5
&Ser-D-Pro-D-Trp-Ser-D-Pro-D-Trp&	−7.4
&Ser-D-Pro-D-Ile-Ser-D-Pro-D-Ile&	−7.3
&Ser-D-Pro-Ile-Ser-D-Pro-Ile&	−7.2
&D-Ser-Pro-Ala-D-Ser-Pro-Ala&	−7.1
&Glu-D-Pro-Trp-Glu-D-Pro-Trp&	−7.0
&Ile-D-Pro-D-Trp-Ile-D-Pro-D-Trp&	−6.8
&Ser-D-Pro-Ala-Ser-D-Pro-Ala&	−6.8
&Ile-D-Pro-Trp-Ile-D-Pro-Trp&	−6.7
&D-Arg-Pro-Trp-D-Arg-Pro-Trp&	−6.1
&Ser-D-Pro-Glu-Ser-D-Pro-Glu&	−6.1
&Glu-D-Pro-D-Trp-Glu-D-Pro-D-Trp&	−6.1
&Ser-D-Pro-D-Glu-Ser-D-Pro-D-Glu&	−6.1
&Ser-Pro-Ala-Ser-Pro-Ala&	−5.6
&Glu-D-Pro-Ile-Glu-D-Pro-Ile&	−4.6
&Glu-D-Pro-D-Ile-Glu-D-Pro-D-Ile&	−4.4
&Gly-Pro-Ala-Gly-Pro-Ala&	−2.9

Table 1. Docking score of the virtual library of C2-symmetric cyclic hexapeptides. & symbol means cyclic peptides

We performed an initial computational analysis with the SiteMap module of Schrodinger Suite²⁴ and identified a potentially druggable area for ligand binding in a cavity formed by the extracellular loops of the N-terminal transmembrane (TM) domain of OmpA. We hypothesized that the size and shape of this predicted druggable area of OmpA may allow for accommodation of a hexapeptide ligand. Considering that cyclization increases the proteolytic resistance and restrains the conformational flexibility of peptide sequences, we designed a virtual library of 26 C2-symmetric cyclic hexapeptides as potential OmpA-binders (Table 1). All cyclic hexapeptides contained two fixed proline residues to facilitate cyclization. This peptide library was subsequently computationally screened against the TM domain of OmpA of both *E. coli* and *A. baumannii* and ranked on the basis of the scoring function (see “Methods” section). As no three-dimensional structure of the TM domain of *A. baumannii* OmpA was found in the Protein Data Bank (PDB), a homology model using the i-TASSER server was built using the structures of the homologous domain of *E. coli* (PDB entries 1G90, 2GE4, 1QJP, and 1BXW) as template. Similar docking results were obtained for the OmpA proteins of both pathogens. Notably, all peptides containing tryptophan (Trp) and arginine (Arg) residues showed better *in silico* activity compared to other hexapeptides (Table 1). The peptide-protein complex models generated by docking suggested that the best-scoring peptides bind in the same protein region and adopt similar orientations in the interaction with both proteins (Fig. S1). One of the Trp residues of the peptide acts as an anchor and inserts in the border of the β -barrel, while the remaining peptide residues contact with the extracellular flexible loops. The possible contact of the peptide with extracellular loops could affect the function of OmpA by reducing their interaction with host cells and consequently bacterial pathogenesis. It is well known that inhibition and mutation of the extracellular loops of OmpA affect the pathogenesis and the interaction of *E. coli* with host cells^{25,26}.

To experimentally validate the virtual screening, we synthesized a set of seven peptides (Table 2, Fig. S2). Four of them (AOA-1 to AOA-4) were Arg-Trp-containing peptides in which the position and/or stereochemistry of the amino acid residues were modified. These included the best-scoring docking peptides (AOA-1 and AOA-2). Additionally, two peptides were synthesized in which the positively charged arginine residue was replaced by a neutral hydrophilic serine (AOA-5) or by a negatively charged glutamic acid (AOA-6). As a control, the linear version (SXV4) of the *in silico* most active peptide was also synthesized.

***In vitro* effect of OmpA inhibitor peptides on *A. baumannii* growth and contact with host cells.**

In the initial screening, the bactericidal activity of the synthetic peptides and their toxicity on human lung epithelial cells (A549) were evaluated. We confirmed that these peptides did not show bactericidal or cytotoxic activities, compared with colistin, as the positive control peptide (Tables S1 and S2), and therefore fulfill all the features to be only potential blockers of OmpA, without killing either bacteria or cells.

Name	Cyclic peptide	Purity (%)	Rational
AOA-1	&Arg-D-Pro-Trp-Arg-D-Pro-Trp&	96	Top-scoring docking peptide
AOA-2	&Trp-D-Pro-Arg-Trp-D-Pro-Arg&	92	Top-scoring docking peptide
AOA-3	&Arg-Pro-D-Trp-Arg-Pro-D-Trp&	100	Different stereoisomer
AOA-4	&D-Arg-Pro-Trp-D-Arg-Pro-Trp&	95	Different stereoisomer
AOA-5	&Ser-D-Pro-Trp-Ser-D-Pro-Trp&	100	Arg replaced by Ser
AOA-6	&Glu-D-Pro-Trp-Glu-D-Pro-Trp&	95	Arg replaced by Glu
SXV4	Ac-Trp-D-Pro-Arg-Trp-D-Pro-Arg-OH	100	Negative Control

Table 2. List of synthesized hexapeptides based on the computationally screened library.

The ability to reduce *A. baumannii* adherence to A549 cells was tested in all the compounds synthesized. Among them, peptide AOA-2 (&Trp-D-Pro-Arg-Trp-D-Pro-Arg&) presented the greatest ability to reduce the *A. baumannii* adherence to A549 cells (Fig. S3).

NMR detection of AOA-2 binding to OmpA. Considering that AOA-2 provided analogous docking results with the *E. coli* and *A. baumannii* OmpA homologs, we hypothesized that *E. coli* OmpA represents an optimal model system for *in vitro* characterization of the intermolecular interaction of AOA-2 with OmpA proteins. *E. coli* OmpA has been extensively characterized and the protocol to produce pure and functional *E. coli* OmpA has been previously reported³¹.

We assessed the binding of AOA-2 to *E. coli* OmpA by solution NMR. As an indication of binding, the presence of OmpA solubilized in 1 mM Triton X-100 causes signal broadening and chemical shift changes in the proton resonances of AOA-2. The 1D ¹H NMR spectrum of AOA-2 was unaltered by the presence of 1 mM Triton X-100, demonstrating that the perturbations were induced by OmpA (Fig. 1A).

The peptide-protein interaction was also clearly observable by Saturation Transfer Difference (STD) NMR experiments of AOA-2 (750 μM) in the presence of OmpA (8 μM). The resulting STD spectrum was obtained by subtracting a spectrum with irradiation at −0.75 ppm, which selectively saturated the protein, from an analogous spectrum with irradiation at 50 ppm, which did not perturb any AOA-2 or OmpA resonances. The STD spectrum reveals signals of the binding peptide that have been perturbed by saturation transfer from the protein (Fig. 1B).

Binding was further confirmed by pulsed field gradient (PFG) NMR-based diffusion experiments. In these experiments, PFG causes a decrease in signal intensity that depends on the gradient strength, and on the translational diffusion of the observed molecule, and is more pronounced for rapidly diffusing, small molecules. As shown in Fig. 1C–E, the attenuation of AOA-2 signals was smaller in the presence of the protein indicating that AOA-2 is interacting with OmpA and then has a slower translational diffusion.

In vitro effect of AOA-2 against GNB contact with host cells. AOA-2 (Fig. 2A,B) was selected for the following studies on the basis of its greater ability to reduce the bacterial adherence (Fig. S3). This peptide showed a reduction in the adherence of *A. baumannii* to A549 cells by more than 60% *in vitro* using 0.25 mg/mL of the compound (Fig. 2C). Due to highly conservation of OmpA among most of the GNB, the same assay using *P. aeruginosa* and *E. coli* was performed also observing a significant reduction in adherence (Fig. 2C), and without presenting bactericidal activities even at the highest AOA-2 concentration tested (Fig. S4). It is important to note that AOA-2 at concentrations (0.25–1 mg/mL) presents different bacteriostatic activities on different bacteria. Thus, it appears to have high anti-adherence/poor bacteriostatic activity on *A. baumannii*, and low anti-adherence/relevant bacteriostatic activity on *P. aeruginosa*, with an intermediate behaviour in the case of *E. coli*.

We previously reported that *ompA*-deficient *A. baumannii* is less adherent to abiotic surfaces and disseminate less between murine organs^{14,27} and that recombinant OmpA shows high affinity for fibronectin, an extracellular matrix protein²⁸. Due to this fact, assays to test the activity of this peptide blocking the interaction between fibronectin and bacteria (*A. baumannii*, *P. aeruginosa* and *E. coli*) were performed, and the results showed a significant decrease in the bacterial adherence to fibronectin after treatment with AOA-2 (Fig. 2D,E). In the same line, other approach using D-amino acids has been performed recently to assess their antivirulence activity against *A. baumannii* and *P. aeruginosa*²⁹, and showed that some of them can inhibit both pathogens adherence to eukaryotic cells and protect against infection of these eukaryotic cells with *P. aeruginosa*²⁹.

AOA-2 effect on biofilm formation by GNB. Many reports have demonstrated the involvement of OmpA in biofilm formation by GNB^{10,27,30,31}. These reports showed that *ompA*-deficient *A. baumannii* and *E. coli* did not produce biofilm^{10,27,31}. Here, we showed that treatment with AOA-2 diminishes the biofilm formation of all the reference strains and clinical isolates of *A. baumannii*, *P. aeruginosa*, and *E. coli* (Table 3). Bacterial biofilms have significant impacts in industrial and clinical settings and there is therefore an urgent need to develop new compounds to prevent biofilm formation. Our data with AOA-2 showed remarkable results and are consistent with those previously reports for other inhibitors^{29,32,33}.

In vitro and in vivo effect of AOA-2 against GNB virulence. We have proved using different assays that AOA-2 is able to block the interaction between different bacteria and host cells, however the real aim of this compound is to prevent the cell death. The presence of 0.25 or 0.5 mg/mL AOA-2, prevented cell death dependent on bacterial adherence^{10,34}, with the exception of *E. coli* strain ATCC 25922 (Fig. 3A). Interestingly, AOA-2 has

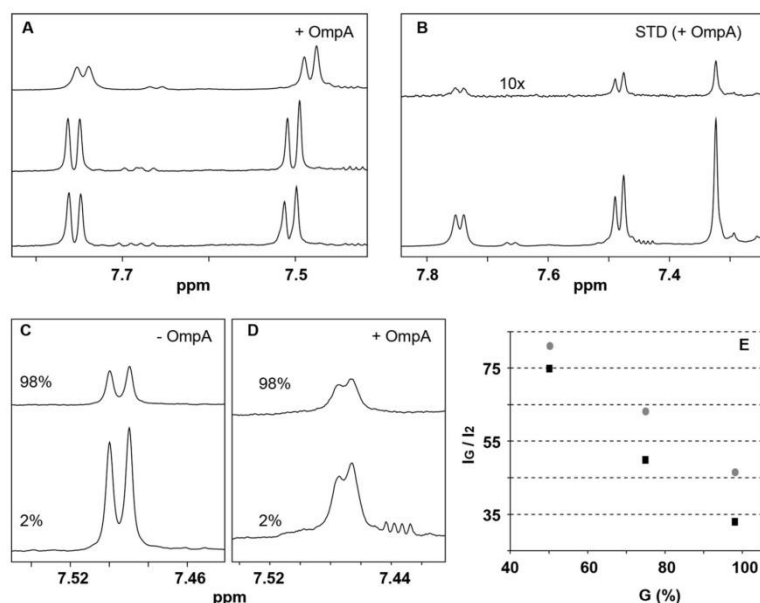


Figure 1. NMR detection of AOA-2 binding to OmpA. (A) Aromatic region of the ^1H -NMR spectra of AOA-2 (750 μM) (bottom), AOA-2 (750 μM) in the presence of 1 mM Triton X-100 (middle), and AOA-2 (750 μM) in the presence of 1 mM Triton X-100 and 8 μM OmpA (top). The presence of OmpA causes signal broadening and chemical shift changes in the AOA-2 resonances. (B) Selected region of the STD spectrum (top) of AOA-2 (750 μM) in the presence of OmpA (8 μM). The reference off-resonance spectrum (bottom) is also shown. The STD spectrum has been scaled by a factor of 10. (C–E) Diffusion NMR detection of AOA-2 binding to OmpA. (C,D) Expansions of PFG-NMR diffusion experiments of AOA-2 (750 μM) with 1 mM Triton X-100 in the absence (C) and in the presence of 8 μM OmpA (D). In both panels, diffusion gradients were 2% (bottom) and 98% (top) of their maximum value ($\approx 55 \text{ G/cm}$). (E) Ratio of the intensity ($100 \cdot I_G / I_{2\%}$) of the AOA-2 signal resonating at ca. 7.50 ppm for a given diffusion gradient strength (I_G) with respect to that measured ($I_{2\%}$) with the weaker diffusion gradient (2%). Peak intensity ratios were obtained in the absence (black squares) and in the presence of 8 μM OmpA (grey circles). As an indication of binding, AOA-2 appeared to diffuse slower (smaller signal attenuation) in the presence of OmpA than in isolation.

no effect on cell death caused by *ompA*-deficient *A. baumannii* which confirm that AOA-2 specifically acts by inhibiting OmpA function (Fig. S5). The failure of AOA-2 against *E. coli* may be attributable to the presence of other highly virulent factors circumventing the loss of OmpA³⁵, acting differently to those of *P. aeruginosa* and *A. baumannii*. The difference in activity between *A. baumannii* and the other two bacterial strains is due to the fact that the compound was designed specifically to be active against *A. baumannii* OmpA; however, it is also active against other GNBs due to the high sequence homology of the OmpA protein, therefore we may think that better results could be achieved for both *E. coli* and *P. aeruginosa*, by using its own OmpA or homologous protein.

We have demonstrated that AOA-2 reduced the interaction of GNB with host cells and prevented their death *in vitro*, and further studies in mice did not reveal any evidence of toxicity at a dose $\leq 40 \text{ mg/kg}$ (Table S3). To prove the bioavailability of AOA-2 when administered i.p. to mice pharmacokinetic studies indicated that AOA-2 showed good activity (Fig. S6).

In a peritoneal sepsis murine model, administration of 10 mg/kg AOA-2 to mice 2 h after intraperitoneal (i.p.) challenge with minimal lethal doses of *A. baumannii* ATCC 17978, *P. aeruginosa* PaO1, and *E. coli* ATCC 25922 strains reduced the bacterial load in the spleen (4.54, 4.04, and 3.36 log CFU/g, respectively) and lungs (4.34, 4.29, and 3.47 log CFU/g, respectively) (Fig. 3B). In addition to this significant decrease of the bacterial load positive blood cultures and mouse mortality were also decreased (Fig. 3C). The possible explanation of the good therapeutic effect of AOA-2 could be the fact that AOA-2 would affect the interaction of bacteria with host cells which prevents their evasion from the immune host defence. These results are consistent with previous observations that absence of OmpA in *A. baumannii* and *E. coli* is associated with the loss of their virulence *in vivo* by reducing their dissemination between organs and animals mortality^{14,15}.

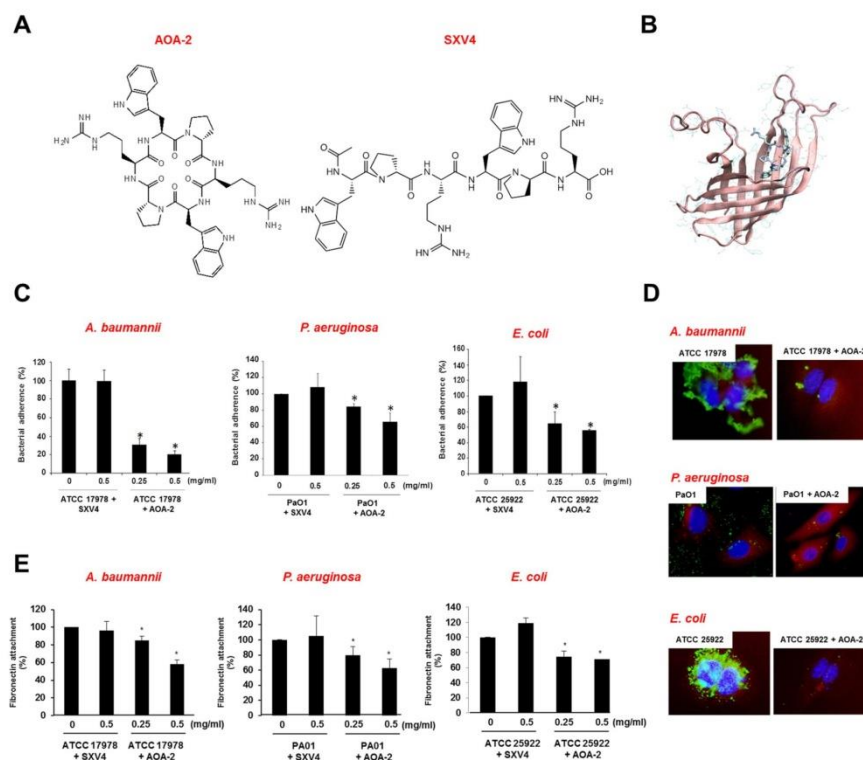


Figure 2. AOA-2 inhibits *A. baumannii*, *P. aeruginosa* and *E. coli* contact with host cells *in vitro*. (A) Chemical structure of AOA-2 and SXV4 (negative control lineal peptide). (B) Three-dimensional representation of AOA-2 and OmpA complex. (C) Adhesion of *A. baumannii* ATCC 17978, *P. aeruginosa* PaO1, and *E. coli* ATCC 25922 strains to A549 cells. A549 cells were infected with 10^8 CFU/mL of ATCC 17978, PaO1 or ATCC 25922 strains for 2 h in the presence of AOA-2 or SXV4 (0, 0.25 or 0.5 mg/mL). (D) Immunostaining of fibronectin of A549 cells (red) and ATCC 17978, PaO1, and ATCC 25922 strains (green) pretreated with AOA-2 (0 and 0.25 mg/mL), after bacterial adherence for 2 h, was performed by specific primary antibodies against these strains and their respective secondary antibodies. Blue staining shows the location of A549 cell nuclei. (E) Bacterial interaction with immobilized fibronectin. ATCC 17978, PaO1, or ATCC 25922 strains pretreated with AOA-2 or SXV4 (0, 0.25 or 0.5 mg/mL) were incubated in a fibronectin-coated 96-well plate for 2 h. Bacteria adhered to fibronectin were quantified by serial dilutions as described in materials and methods. Representative results of three independent experiments are shown; data are means \pm SEM. * $P < 0.05$: between untreated and treated groups.

So far, we have reported a cyclic hexapeptide (AOA-2) able to inhibit the GNB adherence to host cells and, consequently, an increase in the cell viability. At the same time, this peptide shows a potent inhibitor activity on the biofilm formation by these GNB. AOA-2 *in vivo* administration shows a large decrease in the bacterial loading in both spleen and lungs together with a significant decrease in mouse mortality, especially in *A. baumannii*.

In summary, this drug discovery program must be considered as an initial stage of the development of a novel class of antimicrobial agents. The efficacy of AOA-2 can be further tested in experiments administering this new peptide in combination with antimicrobial agents used in the clinical setting, with the aim to improve the therapeutic efficacy in severe infections, avoiding their mortalities despite the currently available antimicrobial therapies.

Methods

Bacterial strains. The list of bacterial strains was regrouped in Table S4.

Pathogen	Strain	Absorbance at 580 nm	
		Without AOA-2	With AOA-2
<i>A. baumannii</i>	ATCC 17978	1.16 ± 0.14	0.54 ± 0.23
	ATCC 19606	0.98 ± 0.1	0.61 ± 0.1
	77	0.98 ± 0.05	0.73 ± 0.08
	C4	1.04 ± 0.003	0.5 ± 0.006
	C5	0.9 ± 0.05	0.42 ± 0.06
	C12	0.99 ± 0.003	0.51 ± 0.02
	IB1	1.12 ± 0.11	0.58 ± 0.04
	IB2	1.08 ± 0.02	0.43 ± 0.06
	HC1	0.83 ± 0.06	0.41 ± 0.1
	HC2	0.97 ± 0.11	0.52 ± 0.1
<i>P. aeruginosa</i>	PaO1	0.77 ± 0.02	0.53 ± 0.05
	15	0.86 ± 0.02	0.2 ± 0.01
	17	0.84 ± 0.02	0.18 ± 0.002
	61	0.57 ± 0.01	0.21 ± 0.01
	127	0.71 ± 0.02	0.18 ± 0.01
	142	0.93 ± 0.03	0.27 ± 0.01
	160	0.91 ± 0.02	0.17 ± 0.01
	184	1.00 ± 0.12	0.41 ± 0.07
	204	0.71 ± 0.02	0.37 ± 0.01
<i>E. coli</i>	ATCC 10536	0.68 ± 0.019	0.2 ± 0.02
	12-69	0.41 ± 0.02	0.19 ± 0.02
	7-9	0.27 ± 0.03	0.09 ± 0.01
	7-2	0.26 ± 0.03	0.13 ± 0.01
	11-51-2	0.32 ± 0.01	0.21 ± 0.007
	5-38	0.17 ± 0.01	0.09 ± 0.006
	12-74	0.23 ± 0.01	0.18 ± 0.007

Table 3. Effect of AOA-2 on biofilm formation by reference strains and clinical isolates of *A. baumannii*, *P. aeruginosa* and *E. coli*.

Docking and molecular modelling. All molecular docking calculations, and preparation of protein and ligand systems were done with SCHRODINGER software package²⁴. Protein structures of the transmembrane domain of *A. baumannii* OmpA were obtained by homology modeling. Homology modeling constructs a model of the “target” protein from its amino acid sequence and an experimental three-dimensional structure (X-ray or NMR) of a related homologous protein (“template”). I-TASSER online server (<http://zhanglab.cmb.med.umich.edu/I-TASSER/>) was used for homology modeling³⁶. The amino acid sequence was taken from Genbank, and template structures used in the modeling were taken from the *E. coli* OmpA transmembrane domain structures presented in the Protein Data Bank (PDB) depository. Two PDB entries obtained from NMR (1G90 and 2GE4), and two X-Ray crystals (1QJP, 1BXW) were used in all homology models. Best-ranked models were prepared with Protein Preparation Wizard, minimized³⁴, and further relaxed including short (5 ns) explicit solvent molecular dynamics (MD) simulations with Desmond software³⁷. The SiteMap module of the Schrodinger Suite²⁴ identified a potentially druggable area for ligand binding in the border of opening of the transmembrane domain of OmpA and flexible extracellular loops. Same area was used for constructing docking grids for Glide. A library of cyclic hexapeptides was used for virtual screening. All peptide structures were built, optimized by LigPrep²⁴ and additional MacroModel conformational search techniques were applied to all molecules. Thus, for each molecule of the library were obtained 10 to 20 different molecular conformations. All received conformations were docked using XP Glide protocol and best-scored results for each hexapeptide were stored.

Materials for peptide synthesis. Protected amino acids and resins were supplied by Luxembourg Industries (Tel-Aviv, Israel), Neosystem (Strasbourg, France), Calbiochem-Novabiochem AG (Laüfelfingen, Switzerland), PolyPeptide Laboratories (Torrance, CA USA), Bachem AG (Bubendorf, Switzerland), and Iris Biotech (Marktredwitz, Germany). PyBOP was provided by Calbiochem-Novabiochem AG. Piperidine was obtained from SDS (Peypin, France); *N,N*-diisopropylethylamine (DIEA) was obtained from Merck (Darmstadt, Germany) and Triisopropylsilane (TIS) and ninhydrin were from Fluka Chemika (Buchs, Switzerland). HOAt was purchased from GL Biochem Shanghai Ltd. (Shanghai, China). Solvents for peptide synthesis and RP-HPLC (dimethylformamide (DMF), dichloromethane (DCM) and acetonitrile (MeCN)) were from Scharlau or SDS (Barcelona, Spain). Trifluoroacetic acid (TFA) was purchased from Kali Chemie (Bad Wimpfen, Germany). The other chemicals used were from Aldrich (Milwaukee, WI USA) and were of the highest purity commercially available.

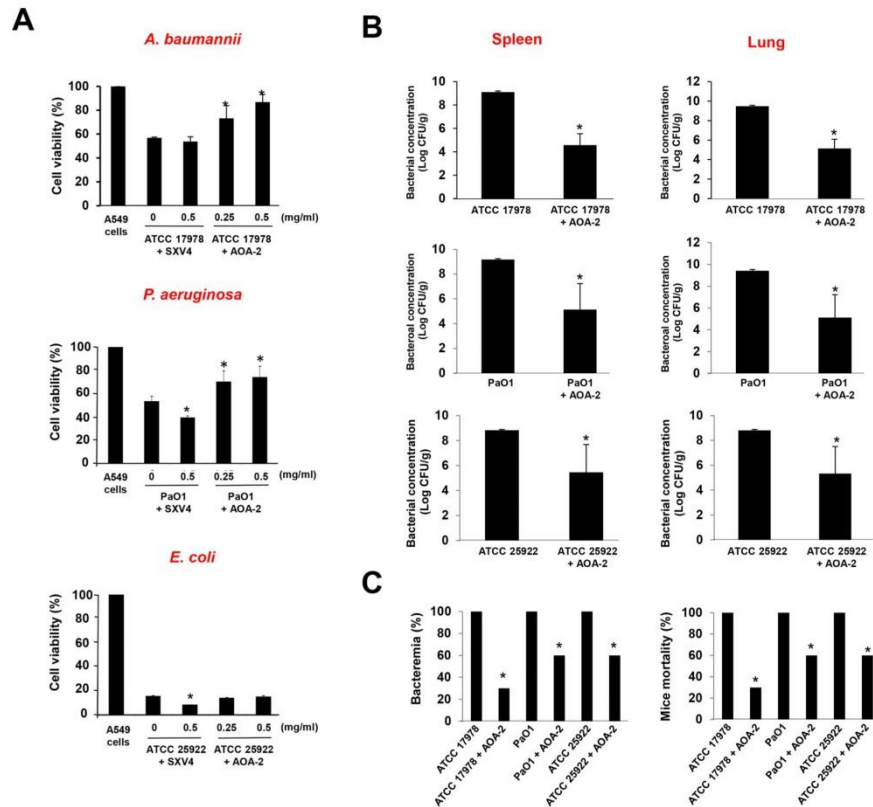


Figure 3. AOA-2 inhibits *A. baumannii*, *P. aeruginosa* and *E. coli* virulence *in vitro* and *in vivo*. (A) Cell death induced by *A. baumannii* ATCC 17978, *P. aeruginosa* PaO1, and *E. coli* ATCC 25922 strains. A549 cells were infected for 24 h with 10^8 CFU/mL of ATCC 17978, PaO1 or ATCC 25922 strains pretreated with AOA-2 or SXV4 (negative control lineal peptide) (0, 0.25 or 0.5 mg/mL). Bacterial cytotoxicity was assessed by monitoring the mitochondrial reduction activity using the MTT assay. Representative results of three independent experiments are shown; data are means \pm SEM. (B) CFU/g of ATCC 17978, PaO1 or ATCC 25922 strains harvested from spleen and lungs of mice infected intraperitoneally with the MLD of ATCC 17978, PaO1 or ATCC 25922 strains and treated or not with AOA-2 (10 mg/kg/d, for 3 days) 2 h after bacterial inoculation. (C) Bacteremia and survival from the previous mouse groups. * $P < 0.05$; between untreated and treated groups.

Peptide synthesis. Peptides were synthesized on a 2-Chlorotryl chloride resin by solid-phase peptide synthesis using the 9-fluorenylmethoxycarbonyl/*tert*-butyl (Fmoc/*t*Bu) strategy. N^H -Fmoc-protected amino acids (3 eq)/HOAt (3 eq), PyBOP (4 eq), and DIEA (6 eq) were used for couplings. The Fmoc protecting group was removed by treatment with a solution of 20% piperidine in DMF. Peptides were cleaved using 2% TFA in DCM. For the cyclization step, the solvent used was DCM/DMF (98:2), PyAOP (2 eq) was dissolved in DMF and the peptide (5 mM) in DCM and once is mixed in the right proportions, 6 eq of DIEA were added, the reaction was completed in 2 or 3 h. After the cyclization was carried out, the deprotection of the side chains was performed using TFA/TIS/ H₂O (95:2.5:2.5). The peptides were analysed at $\lambda = 220$ nm by analytical HPLC [Waters Alliance 2695 separation module equipped with a 2998 photodiode array detector, Sunfire C₁₈ column (100 mm \times 4.6 mm \times 3.5 mm, 100 Å, Waters), and Empower software; flow rate = 1 mL/min. The peptides were then purified by semi-preparative HPLC [Waters 2700 Sample Manager equipped with a Waters 2487 dual λ absorbance detector, a Waters 600 controller, a Waters fraction collection II, a Symmetry C₁₈ column (100 mm \times 30 mm, 5 mm, 100 Å, Waters) and Millenium chromatography manager software]. Flow rate = 15 mL/min; solvents: A = 0.1% trifluoroacetic acid in water, and B = 0.05% trifluoroacetic acid in acetonitrile. Peptides were characterized by

MALDI-TOF mass spectrometry (Voyager-DE RP MALDI-TOF, PE Biosystems with a N₂-laser of 337 nm) and a high resolution ESI-MS model (LTQ-FT Ultra, Thermo Scientific).

Protein. A recombinant 37 kDa polypeptide fragment containing the transmembrane and periplasmic domains of the *E. coli* OmpA protein was purchased from NovoPro (China). OmpA samples contained Triton X-100 to mimic the membrane environment.

Nuclear Magnetic Resonance (NMR). All NMR experiments were recorded at 25 °C on a Bruker Avance 800 MHz spectrometer equipped with a cryoprobe. Unless otherwise stated, AOA-2 samples (750 µM) were prepared on 10 mM sodium phosphate buffer (pH 7.3), 100% D₂O, 0.01% NaN₃, 1 mM Triton X-100 in the absence or in the presence of OmpA (8 µM).

Saturation transfer difference³⁸ (STD) experiments were obtained using a pseudo-2D pulse sequence for the interleaved acquisition of on-resonance and off-resonance spectra. Total saturation time was 3 seconds. Suppression of the residual water signal was achieved by excitation sculpting³⁹. The final STD spectrum was obtained by subtracting the on-resonance spectrum, which saturates the protein (irradiation at −0.75 ppm), from the off-resonance one (irradiation at 50 ppm), which does not affect any ligand or OmpA resonances.

Diffusion NMR experiments were performed using the LED pulse sequence⁴⁰ with gradient lengths of 3 ms and a diffusion delay of 110 ms. The total inter-scan delay was 4.5 s. A series of experiments applying diffusion gradients of 2%, 50%, 75%, and 98% of its maximum value (55 G cm^{−1}) were acquired for AOA-2 (750 µM) in 10 mM sodium phosphate buffer (pH 7.3), 100% D₂O, 0.01% NaN₃, 1 mM Triton X-100 in the absence and in the presence of OmpA (8 µM).

Cell culture and infection. Human type II pneumocyte cell line A549 derived from a human lung carcinoma were obtained from American Type Culture Collection (LGC, UK) and were grown in DMEM medium (Invitrogen, Spain) supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum, vancomycin (50 µg/mL), gentamicin (20 µg/mL), amphotericin B (0.25 µg/mL) (Invitrogen, Spain) and 1% HEPES (Invitrogen, Spain) in a humidified incubator, 5% CO₂, at 37 °C. A549 cells were routinely passaged every 3–4 days. The cells were seeded 24 h in 96-well plates for cellular viability assay, and in 24 well plates for adhesion and immunofluorescence assays.

Cellular viability. *Peptide toxicity.* A549 cells were incubated with AOA-1, AOA-2, AOA-3, AOA-4, AOA-5, AOA-6, or negative control peptide SXV4 (0, 0.25, 0.5 and 1 mg/mL) 48 h with 5% CO₂ at 37 °C. Prior the evaluation of the peptides cytotoxicity, A549 cells were washed three times with prewarmed PBS. Then, peptides cytotoxicity was initially assessed quantitatively by monitoring the mitochondrial reduction activity using the MTT assay as described previously²⁷. The percentage of cytotoxicity was calculated from the optical density (OD) as follow: [(OD of treated cells / mean OD of non-treated cell) × 100].

Bacterial cytotoxicity. A549 cells were infected with 10⁸ CFU/mL of *A. baumannii* ATCC 17978, *P. aeruginosa* PaO1, and *E. coli* ATCC 25922 strains pretreated with AOA-2 or SXV4 (0, 0.25 and 0.5 mg/mL, 30 min) for 24 h with 5% CO₂ at 37 °C. Prior the evaluation of bacterial cytotoxicity, we firstly removed viable bacteria from A549 cells cultures and washed A549 cells five times with pre-warmed PBS. Then, cellular viability was assessed as indicated above.

Adhesion assays. *A. baumannii* ATCC 17978, *P. aeruginosa* PaO1, and *E. coli* ATCC 25922 strains were incubated with AOA-1, AOA-2, AOA-3, AOA-4, AOA-5, AOA-6, or SXV4 (0, 0.25, 0.5 and 1 mg/mL, 30 min), and added to A549 cells for 2 h at 5% CO₂ and 37 °C. Subsequently, infected A549 cells were washed five times with pre-warmed PBS and lysed with 0.5% Triton X-100. Diluted lysates were plated onto blood agar (Blood-Agar Columbia, Becton Dickinson Microbiology Systems, USA) and incubated at 37 °C for 24 h for enumeration of developed colonies and then the determination of the number of bacteria that attached to A549 cells.

Immunofluorescence. The A549 cells plated on coverslips were incubated with *A. baumannii* ATCC 17978, *P. aeruginosa* PaO1 or *E. coli* ATCC 25922 strains for 2 h, and later were incubated with AOA-2 or SXV4 (0 and 0.25 mg/mL, 30 min) at 5% CO₂ and 37 °C. Bacterial cells were removed and A549 cells were washed five times with cold PBS. A549 cells on the coverslips were fixed in methanol for 8 min at −20 °C, permeabilized with 0.5% Triton X-100 and blocked with 20% pork serum in PBS. Primary antibodies: anti-OMPs of *A. baumannii* produced in mouse kindly gift by MJ McConnell, mouse anti-*P. aeruginosa* (Abcam, Spain), mouse anti-*E. coli* (Abcam, Spain), and rabbit anti-human fibronectin (Sigma, Spain) were used at dilution of 1:50, 1:100, 1:100 and 1:400, respectively, in PBS containing 1% bovine serum albumin (BSA) for 2 h. After washing with PBS, the coverslips were incubated with their respective secondary antibodies: Alexa488-conjugated goat anti-mouse IgG, and Alexa594-conjugated goat anti-rabbit IgG (Invitrogen, Spain) at dilution of 1:100, 1:200, 1:200 and 1:800, respectively, in PBS containing 1% BSA for 1 h. The fixed coverslips were incubated for 10 min at room temperature with DAPI (Appliechem, Germany) (0.5 µg/mL), washed with PBS, mounted in fluorescence mounting medium (DakoCytomation, Spain), and visualized using a Leica fluorescence microscope (DM-6000; Leica Microsystems Wetzlar GmbH, Germany).

Fibronectin-binding assay. Fibronectin-binding assay was performed as described previously²⁸. Briefly, *A. baumannii* ATCC 17978, *P. aeruginosa* PaO1, and *E. coli* ATCC 25922 grown overnight at 37 °C in LB were resuspended in PBS and collected by centrifugation at 5,000 × g for 10 min. Bacteria were washed twice in sterile PBS, resuspended in the same sterile buffer, and incubated with AOA-2 or SXV4 (0, 0.25 and 0.5 mg/mL, 30 min). Then, 50 µL of bacterial suspension were mixed with 50 µL of PBS, added to fibronectin coated wells and incubated 2 h at room temperature for bacterial adsorption. Non-adhered bacteria were discarded and wells were

washed six times with sterile PBS to remove unbound bacteria. Adherent bacteria were then collected with 125 μ L of sterile PBS containing 0.5% Triton X-100. Diluted lysates were plated onto sheep blood agar and incubated at 37 °C for 24 h for enumeration of developed colonies and then the determination of the number of bacteria that attached to fibronectin.

Biofilm. An abiotic solid surface biofilm formation assay was performed as described previously²⁷. In brief, we used an overnight culture of 2 reference strains and 8 clinical isolates of *A. baumannii*, 1 reference strain and 8 clinical isolates of *P. aeruginosa*, and 1 reference strain and 6 clinical isolates of *E. coli* diluted 1:1 in fresh Luria Bertani (LB) in 96 well plates that were incubated in presence or not of 0.25 mg/mL AOA-2 without shaking at 37 °C during 24 h. Biofilm was stained with crystal violet 0.4% (v/v) and quantified at 580 nm after solubilization with ethanol 95%.

Animals. Immunocompetent C57BL/6 female mice (16–18 g) were obtained from University of Seville facility; they had a sanitary status of murine pathogen free and were assessed for genetic authenticity. Animals were housed in regulation cages with food and water ad libitum. This study was carried out in strict accordance with the recommendations in the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals⁴¹. The protocol was approved by the Committee on the Ethics of Animal Experiments of the University Hospital of Virgen del Rocio, Seville (2012PI/238). All surgery was performed under sodium thiopental anaesthesia, and all efforts were made to minimize suffering.

AOA-2 in vivo toxicity. The Reed and Munch method was used⁴². Groups of 6 mice were intraperitoneally (i.p.) inoculated with a single dose of AOA-2, starting at 10 mg/kg, in 0.5 mL NaCl 0.9%, and the solution were serially duplicated until 100% mortality was reached. The maximum tolerated dose (LD0), the LD50, and LD100 were defined as the concentrations causing 0, 50, and 100% mortality, respectively. LD50 value was determined using the Probit method.

AOA-2 pharmacokinetics. Serum AOA-2 level was determined in healthy mice after a single i.p. administration of 10 mg/kg AOA-2. After 5, 15, 30, 60, 120, 240, 480, and 1440 min, blood was extracted from the periorbital plexuses of the anesthetized mice; three mice were used for each time point. The AOA-2 level was determined using a HPLC-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). The maximum concentration in serum (C_{max}; reported in mg per liter), the area under the concentration-time curve from time zero to ∞ (AUC_{0- ∞} ; reported in mg·min per liter), and the terminal half-life ($t_{1/2}$; reported in min) were calculated using a computer-assisted method⁴³.

***A. baumannii*, *P. aeruginosa* and *E. coli* peritoneal sepsis models.** Murine peritoneal sepsis models with *A. baumannii* ATCC 17978, *P. aeruginosa* PaO1 or *E. coli* ATCC 25922 strains were established by i.p. inoculation of the bacteria⁴⁴. Briefly, mice were inoculated with 0.5 mL of the bacterial suspensions, which were incubated for 20–24 h in LB at 37 °C and mixed in a 1:1 ration with a saline solution containing 10% (w/v) porcine mucin (Sigma, Spain). The minimal bacterial lethal dose 100 (MLD100), LD50 and LD0 were determined by inoculating various groups of mice (6 mice per group) with decreasing amounts of *A. baumannii* ATCC 17978, *P. aeruginosa* PaO1 and *E. coli* ATCC 25922 strains inocula from 8.5 to 2.3, 9.11 to 3.3, 9.13 to 3.47 log CFU/mL, respectively, and monitoring the survival of the mice for 7 days.

Therapeutic effect of AOA-2 in murine models of peritoneal sepsis. The murine peritoneal sepsis models by *A. baumannii* ATCC 17978, *P. aeruginosa* PaO1 or *E. coli* ATCC 25922 strains were established by i.p. inoculation of the bacteria. Briefly, animals were infected i.p. with 0.5 mL of the MLD100 of *A. baumannii* ATCC 17978, *P. aeruginosa* PaO1, or *E. coli* ATCC 25922 strains mixed 1:1 with 10% porcine mucin. AOA-2 therapy was administered 2 h after bacterial inoculation. Fifty-six mice were randomly ascribed to the following groups: 1). controls (without treatment), and 2). AOA-2 administered at 10 mg/kg/d i.p. 2 h after bacterial inoculation with each strain. Mortality was recorded over 72 h. After death or sacrifice of the mice at the end of the experimental period, aseptic thoracotomies were performed, and blood samples were obtained by cardiac puncture for qualitative blood cultures. The spleen and lungs were aseptically removed and homogenized (Stomacher 80; Tekmar Co., USA) in 2 mL of sterile NaCl 0.9% solution. Ten-fold dilutions of the homogenized spleen and lungs were plated onto Sheep blood agar for quantitative cultures (log CFU/g of spleen or lungs).

Statistical analysis. Group data are presented as means \pm standard errors of the means (SEM). For *in vitro* studies, the Student t test was used to determine differences between means. Differences in bacterial spleen and lung concentrations (mean \pm SEM log CFU per gram of tissue) were assessed by analysis of variance (ANOVA) and *post-hoc* Dunnett's and Tukey's tests. Differences in mortality (%) and blood sterility (%) between groups were compared by use of the χ^2 test. P values of <0.05 were considered significant. The SPSS (version 17.0; SPSS Inc.) statistical package was used.

References

- Lewis, K. Platforms for antibiotic discovery. *Nat. Rev. Drug Discov.* **12**, 371–387 (2013).
- Spellberg, B. & Rex, J. H. The value of single-pathogen antibacterial agents. *Nat. Rev. Drug Discov.* **12**, 963 (2013).
- López Rojas, R., Smani, Y. & Pachón, J. Treating multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* infection by blocking its virulence factors. *Expert Rev. Anti Infect. Ther.* **11**, 231–233 (2013).
- Rasko, D. V. & Sperandio, V. Anti-virulence strategies to combat bacteria-mediated disease. *Nat. Rev. Drug Discov.* **9**, 117–128 (2010).
- Wexler, H. M. Outer-membrane pore-forming proteins in Gram-negative anaerobic bacteria. *Clin. Infect. Dis.* **35**, S65–S71 (2002).
- Kuen, M. J. & Kesty, N. C. Bacterial outer membrane vesicles and the host-pathogen interaction. *Genes Dev.* **19**, 2645–2655 (2005).
- Mortensen, B. L. & Skaar, E. P. The contribution of nutrient metal acquisition and metabolism to *Acinetobacter baumannii* survival within the host. *Front. Cell Infect. Microbiol.* **3**, 95 (2013).

8. Smith, S. G., Mahon, V., Lambert, M. A. & Fagan, R. P. A molecular Swiss army knife: OmpA structure, function and expression. *FEMS Microbiol. Lett.* **273**, 1–11 (2007).
9. Azghani, A. O., Idell, S., Bains, M. & Hancock, R. E. *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane protein F is an adhesin in bacterial binding to lung epithelial cells in culture. *Microb. Pathog.* **33**, 109–114 (2002).
10. Gaddy, J. A., Tomaras, A. P. & Actis, L. A. The *Acinetobacter baumannii* 19606 OmpA protein plays a role in biofilm formation on abiotic surfaces and in the interaction of this pathogen with eukaryotic cells. *Infect. Immun.* **77**, 3150–3160 (2009).
11. Krishnan, S. & Prasadara, N. V. Outer membrane protein A and OprF: versatile roles in Gram-negative bacterial infections. *FEBS J.* **279**, 919–931 (2012).
12. Choi, C. H. *et al.* *Acinetobacter baumannii* outer membrane protein A targets the nucleus and induces cytotoxicity. *Cell. Microbiol.* **10**, 309–319 (2008).
13. Choi, C. H. *et al.* Outer membrane protein 38 of *Acinetobacter baumannii* localizes to the mitochondria and induces apoptosis of epithelial cells. *Cell. Microbiol.* **7**, 1127–1138 (2005).
14. Sánchez-Encinales, V. *et al.* Overproduction of outer membrane protein A (OmpA) by *Acinetobacter baumannii* is a risk factor for nosocomial pneumonia, bacteremia and mortality increase. *J. Infect. Dis.* **215**, 966–974 (2017).
15. Weiser, J. N. & Gotschlich, E. C. Outer membrane protein A (OmpA) contributes to serum resistance and pathogenicity of *Escherichia coli* K-1. *Infect. Immun.* **59**, 2252–2258 (1991).
16. Kim, S. W. *et al.* Serum resistance of *Acinetobacter baumannii* through the binding of factor H to outer membrane proteins. *FEMS Microbiol. Lett.* **301**, 224–231 (2009).
17. Wu, L. *et al.* Recognition of host immune activation by *Pseudomonas aeruginosa*. *Science* **309**, 774–777 (2005).
18. Fito-Boncompagni, L. *et al.* Full virulence of *Pseudomonas aeruginosa* requires OprF. *Infect. Immun.* **79**, 1176–1186 (2011).
19. Pautsch, A. & Schulz, G. E. Structure of the outer membrane protein A transmembrane domain. *Nat. Struct. Biol.* **5**, 1013–1017 (1998).
20. Pautsch, A. & Schulz, G. E. High resolution structure of the OmpA membrane domain. *J. Mol. Biol.* **298**, 273–282 (2000).
21. Arora, A., Abildgaard, F., Bushweller, J. H. & Tamm, L. K. Structure of the outer membrane protein A transmembrane domain by NMR spectroscopy. *Nat. Struct. Biol.* **8**, 334–338 (2000).
22. Cierpicki, T., Liang, B., Tamm, L. K. & Bushweller, J. H. Increasing the accuracy of solution NMR structures of membrane proteins by application of residual dipolar couplings. High-resolution structure of outer membrane protein A. *J. Am. Chem. Soc.* **128**, 6947–6951 (2006).
23. Ishida, H., García-Herrero, A. & Vogel, H. J. Solution structure of *Escherichia coli* outer membrane protein A C-terminal domain. *Biochim. Biophys. Acta* **1838**, 3014–3024 (2014).
24. Schrödinger Release 2013-3: Schrödinger Suite 2013 Protein Preparation Wizard; EpiK version 2.6, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2013; Impact version 6.1, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2013; SiteMap, version 2.9, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2013; MacroModel version 9.9; LigPrep, version 2.8, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2013; Glide, version 6.1, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2013.
25. Maruvada, R. & Kim, K. S. Extracellular loops of the *Escherichia coli* outer membrane protein A contribute to the pathogenesis of meningitis. *J. Infect. Dis.* **203**, 131–140 (2011).
26. Pascal, T. A. *et al.* Experimental validation of the predicted binding site of *Escherichia coli* K1 outer membrane protein A to human brain microvascular endothelial cells: identification of critical mutations that prevent *E. coli* meningitis. *J. Biol. Chem.* **285**, 37753–37761 (2010).
27. Smani, Y., Domínguez-Herrera, J. & Pachón, J. Association of the outer membrane protein Omp33 with fitness and virulence of *Acinetobacter baumannii*. *J. Infect. Dis.* **208**, 1561–1570 (2013).
28. Smani, Y., McConnell, M. J. & Pachón, J. Role of fibronectin in the adhesion of *Acinetobacter baumannii* to host cells. *Plos One* **7**, e33073 (2012).
29. Rumbo, C. *et al.* Assessment of antivirulence activity of several d-amino acids against *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Antimicrob. Chemother.* **71**, 3473–3481 (2016).
30. Gicquel, G. *et al.* The extra-cytoplasmic function sigma factor sigX modulates biofilm and virulence-related properties in *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS One* **8**, e80407 (2013).
31. Ma, Q. & Wood, T. K. OmpA influences *Escherichia coli* biofilm formation by repressing cellulose production through the CpxRA two-component system. *Environ. Microbiol.* **11**, 2735–2746 (2009).
32. Guo, Q. *et al.* Identification of a small molecule that simultaneously suppresses virulence and antibiotic resistance of *Pseudomonas aeruginosa*. *Sci. Rep.* **6**, 19141 (2016).
33. Kolodkin-Gal, I. *et al.* D-amino acids trigger biofilm disassembly. *Science* **328**, 627–629 (2010).
34. Smani, Y. *et al.* Platelet-activating factor receptor initiates contact of *Acinetobacter baumannii* expressing phosphorylcholine with host cells. *J. Biol. Chem.* **287**, 26901–26910 (2012).
35. Nielubowicz, G. R. & Mobley, H. L. T. Host-pathogen interactions in urinary tract infection. *Nat. Rev. Urol.* **7**, 430–441 (2010).
36. Roy, A., Kucukural, A. & Zhang, Y. I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction. *Nat. Protoc.* **5**, 725–738 (2010).
37. Molecular Dynamics System, 2012, version 3.1, D. E. Shaw Research, New York, NY. Maestro-Desmond Interoperability Tools, version 3.1, Schrödinger LLC, New York, NY.
38. Mayer, M. & Meyer, B. Characterization of ligand binding by saturation transfer difference NMR spectroscopy. *Angew. Chem. Int. Ed.* **38**, 1784–1788 (1999).
39. Hwang, T. L. & Shaka, A. J. Water Suppression that works. Excitation sculpting using arbitrary wave-forms and pulsed-field gradients. *J. Magn. Reson. Ser. A* **112**, 275–279 (1995).
40. Wu, D. H., Chen, A. D. & Johnson, C. S. An improved diffusion-ordered spectroscopy experiment incorporating bipolar-gradient-pulses. *J. Magn. Reson. Ser. A* **115**, 260–264 (1995).
41. National Research Council. 2011. Guide for the care and use of laboratory animals, 8th ed. National Academies Press, Washington, DC.
42. O'Reilly, T., Cleeland, R. & Squires, E. L. Evaluation of antimicrobials in experimental animal infections. Antibiotics in laboratory medicine (eds. Williams and Wilkins) 604–765 (Lorian, 1996).
43. Usansky, J. L., Desai, A. & Tang-Liu, D. P. K. functions for Microsoft Excel. Department of Pharmacokinetics and Drug Metabolism, <http://www.boomer.org/pkin/soft.html> (2012).
44. Smani, Y., Domínguez-Herrera, J., Ibáñez-Martínez, J. & Pachón, J. Therapeutic efficacy of lysophosphatidylcholine in severe infections caused by *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **59**, 3920–3924 (2015).

Acknowledgements

We thank V. López Casado, A. Gardel, C. Tomi, and C. García for technical help, and J. Sánchez Céspedes for critical review of this manuscript. We also acknowledge the NMR facility of the University of Barcelona (CCIT UB). This study was supported by the *Consejería de Salud y Bienestar* (grant PI12-0069), the *Consejería de Economía, Innovación, Ciencia y Empleo* (grants CTS-6173/12, and 2014LLAV-00064) of Andalusia, Spain, and by Plan Nacional de I + D + i 2008–2011 and Instituto de Salud Carlos III, Subdirección General de Redes y

CAPÍTULO I. Artículo 1

www.nature.com/scientificreports/

Centros de Investigación Cooperativa, Ministerio de Economía y Competitividad, Spanish Network for Research in Infectious Diseases (REIPI RD12/0015/0001) co-financed by European Development Regional Fund "A way to achieve Europe". This work led to the provisional patent application ES P201431400. Y. Smani is supported by the Subprograma Miguel Servet Tipo I from the Ministerio de Economía y Competitividad of Spain [CP15/01358]. IRB Barcelona is the recipient of a Severo Ochoa Award of Excellence from MINECO (Government of Spain).

Author Contributions

M.T., J.V., J.P., E.G., Y.S. conceived the study and designed the experiments. X.V.F., R.P.M., V.S.E., M.V., R.A.A., N.B., S.G., M.E.P.I., M.K., J.G. performed experiments and interpreted data. J.P. and Y.S. wrote the manuscript with the input of all the other authors.

Additional Information

Supplementary information accompanies this paper at <https://doi.org/10.1038/s41598-017-14972-y>.

Competing Interests: The authors declare that they have no competing interests.

Publisher's note: Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2017

Supplementary data

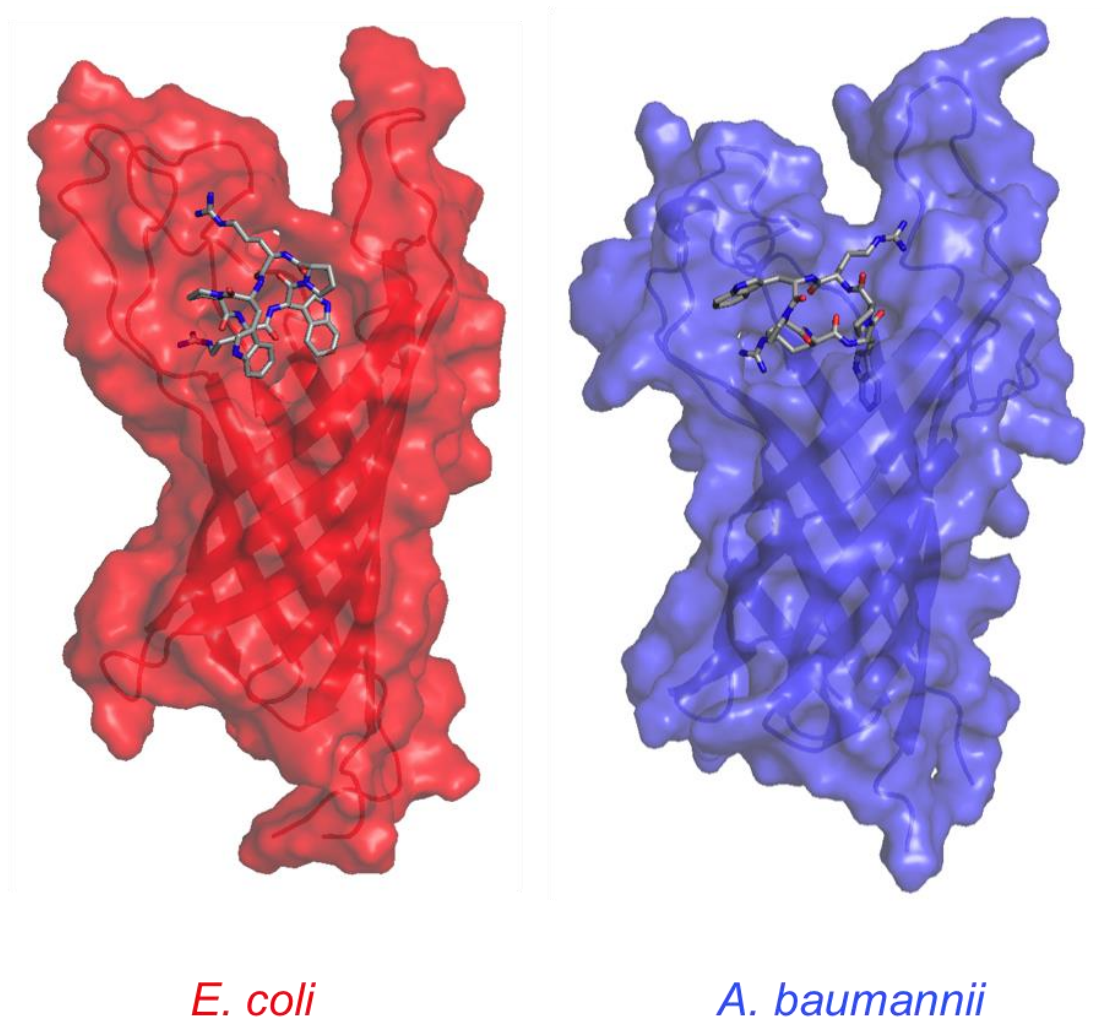


Figure S1. Structural models generated by docking of peptide AOA-2 into the NMR solution structure of the transmembrane domain of *E. coli* OmpA (PDB 1G90) and into the homology model of *A. baumannii* OmpA generated as described under “Methods”. AOA-2 is displayed as sticks.

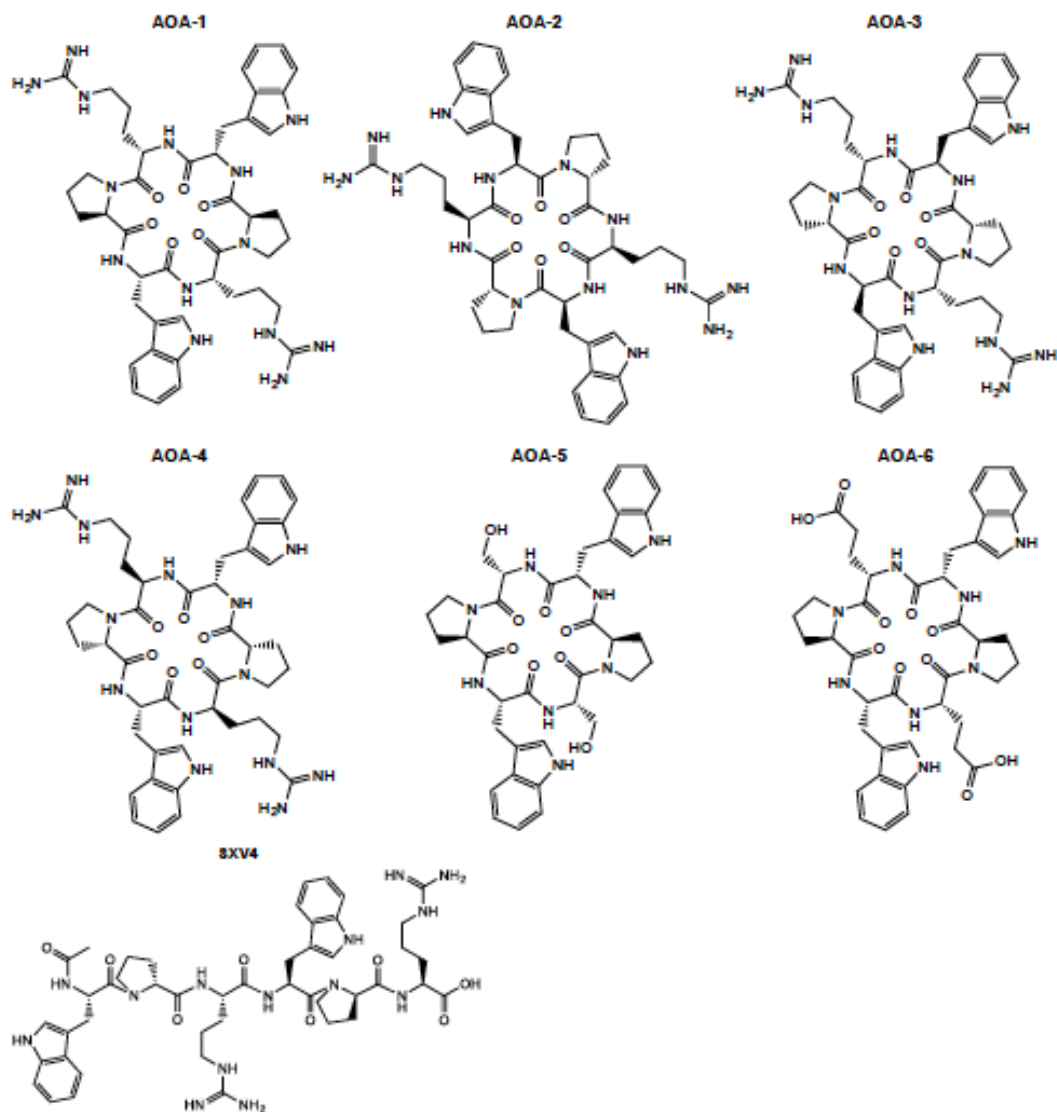


Figure S2. Structure of six cyclic hexapeptides and peptide control (SXV4) used in the study.

CAPÍTULO I. Artículo 1

Table S1. MICs of the six hexapeptides for *A. baumannii* and *E. coli*.

Peptides	MIC (µg/mL)		
	<i>A. baumannii</i> ATCC 17978	<i>P. aeruginosa</i> PaO1	<i>E. coli</i> ATCC 25922
AOA-1	>500	>500	>500
AOA-2	>500	>500	>500
AOA-3	>500	>500	>500
AOA-4	>500	>500	>500
AOA-5	>500	>500	>500
AOA-6	>500	>500	>500
SXV4	>500	>500	>500

MIC: minimal inhibitory concentration

CAPÍTULO I. Artículo 1

Table S2. Percentages of A549 cellular viability assessed through mitochondrial reduction activity (MTT assay) in presence of anti-OmpA hexapeptides and control peptides (SXV4 and COL). COL: colistin. ND: not determined.

Peptides	Cellular viability (%)			
	0.25 mg/mL	0.5 mg/mL	1 mg/mL	5 mg/mL
AOA-1	98.89 ± 0.41	99.69 ± 0.26	99.7 ± 0.38	ND
AOA-2	98.09 ± 0.27	98.33 ± 0.4	98.48 ± 0.55	ND
AOA-3	99.27 ± 0.21	99.7 ± 0.14	99.36 ± 0.3	ND
AOA-4	99.47 ± 0.39	99.77 ± 0.17	100.13 ± 0.18	ND
AOA-5	98.86 ± 0.08	100.05 ± 0.39	100.14 ± 0.46	ND
AOA-6	98.31 ± 0.35	99.14 ± 0.44	99.38 ± 0.34	ND
SXV4	98.17 ± 0.6	98.79 ± 0.28	98.55 ± 0.21	ND
COL	ND	91.85 ± 2.67	68.39 ± 2.93	9.88 ± 0.42

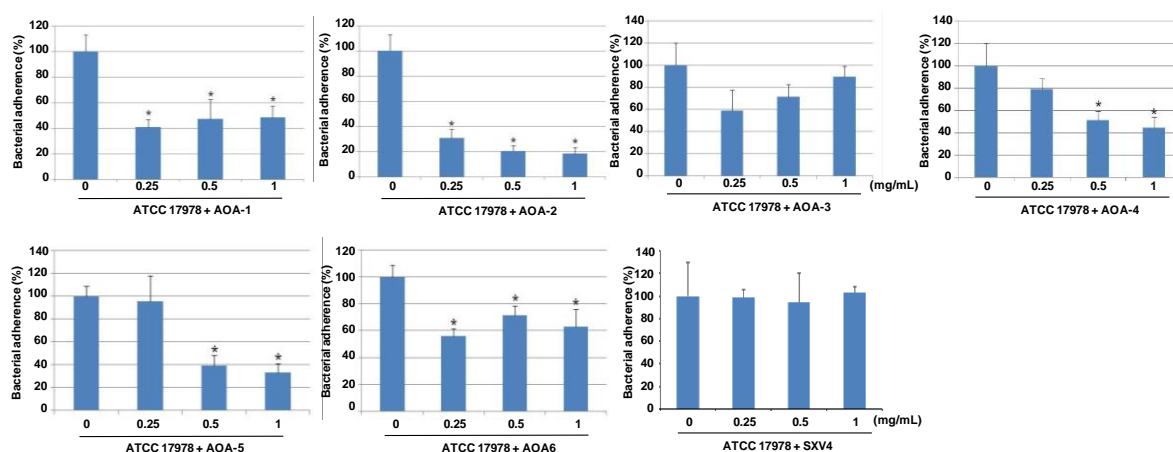


Figure S3. OmpA inhibitor hexapeptides reduce *A. baumannii* adherence to A549 cells. A549 cells were infected with 10^8 CFU/mL of ATCC 17978 strain during 2 h in presence of AOA-1, AOA-2, AOA-3, AOA-4, AOA-5, AOA-6, or SXV4 (0, 0.25, 0.5, or 1 mg/mL). The percentage of bacterial adherence was calculated as follow: [(number of colonies of treated A549 cells with peptide / number of colonies of non-treated cells) x 100]. Representative results of three independent experiments are shown; data are means \pm SEM. * $P < 0.05$: between untreated and treated groups.

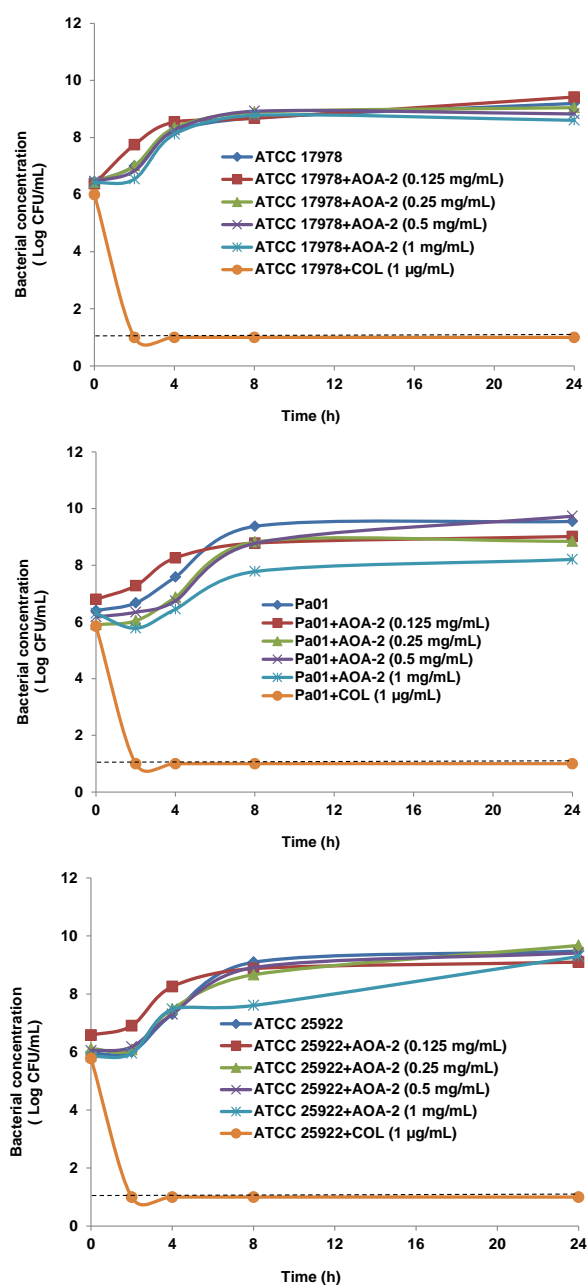


Figure S4. Time kill curves of *A. baumannii* ATCC 17978, *P. aeruginosa* PaO1, and *E. coli* ATCC 25922 strains in presence of 0.125, 0.25, 0.5 and 1 mg/mL AOA-2, and 1 µg/mL colistin. COL: colistin.

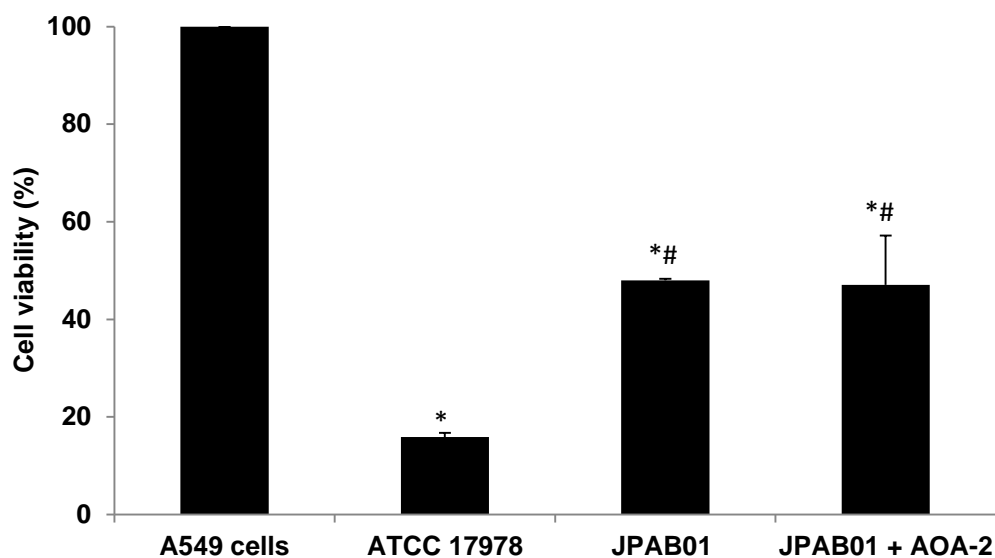


Figure S5. Cell death induced by *A. baumannii* ATCC 17978 and JPAB01 strains. A549 cells were infected for 48 h with 10^8 CFU/mL of ATCC 17978 and JPAB01 strains treated with AOA-2 (0 or 0.5 mg/mL). Bacterial cytotoxicity was assessed by monitoring the mitochondrial reduction activity using the MTT assay. Representative results of two independent experiments are shown; data are means \pm SEM. JPAB01: *ompA*-deficient ATCC 17978 strain. * P <0.05: between infected and non-infected cells, # P <0.05: between untreated and treated groups.

CAPÍTULO I. Artículo 1

Table S3. *In vivo* toxicity of AOA-2. Each group of six mice received 0.5 ml of AOA-2 at 10, 20, 40, 80 or 160 mg/kg. Mice survival was monitored for a one week and lethal doses (LD) 0, 50 and 100 were calculated.

	LD0	LD50	LD100
AOA-2 (mg/kg)	40	85	160

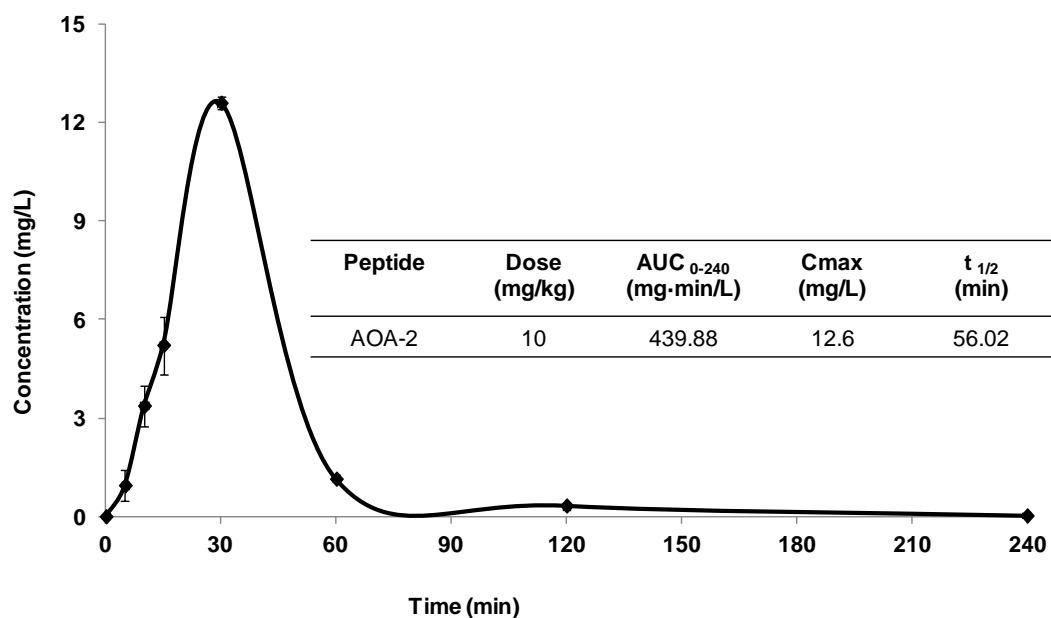


Figure S6. Serum AOA-2 pharmacokinetic parameters. AOA-2 was intraperitoneally administered to mice at a dose of 10 mg/kg, and serum AOA-2 concentrations were analyzed for 240 min. C_{max}, maximum concentration in serum; t_{1/2}, elimination half-time; AUC₀₋₂₄₀, area under the concentration-time curve from time 0 to 240 min.

CAPÍTULO I. Artículo 1

Table S4. Bacterial strains, plasmids, and primers used in this study.

Strains	Relevant features and use	References
<i>A. baumannii</i> ATCC 17978 wt	Reference strain isolated in a fatal meningitis infant	1
<i>A. baumannii</i> ATCC 19606	Reference strain isolated from urine, United States, 1948.	2
<i>A. baumannii</i> C4, C5, C12	Colonizing MDR strains isolated from tracheobronchial aspirate of mechanically ventilated individual adult patients	3
<i>A. baumannii</i> IB1, IB2	Bacteremic MDR strains isolated from tracheobronchial aspirate of mechanically ventilated individual adult patients	3
<i>A. baumannii</i> HC1, HC2	Bacteremic MDR strains isolated from blood of mechanically ventilated individual adult patients	3
<i>A. baumannii</i> 77	MDR strain isolated from respiratory sample.	4
<i>P. aeruginosa</i> PaO1	Reference strain	5
<i>P. aeruginosa</i> 15, 160	Bacteremic MDR strains isolated from blood	6
<i>P. aeruginosa</i> 17, 61, 127, 142, 184, 204	Bacteremic strains isolated from blood	6
<i>E. coli</i> ATCC 25922	Reference strain. Serotype O6, Biotype 1	7
<i>E. coli</i> 12-69, 7-9, 7-2, 11-51-2, 5-38, 12-74	Bacteremic strains isolated from blood in the Virgen Macarena University hospital of Seville.	--

CAPÍTULO I. Artículo 1

References

1. Baumann, P., Doudoroff, M. & Stanier, R.Y. A study of the Moraxella group. II. Oxidative-negative species (genus *Acinetobacter*). *J. Bacteriol.* **95**, 1520-1541 (1968).
2. Schaub, I.G. & Hauber, F.D. A biochemical and serological study of a group of identical unidentifiable gram-negative bacilli from human sources. *J. Bacteriol.* **56**, 379-385 (1948).
3. Labrador Herrera, G. et al. Draft Genome sequences of seven multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* strains, isolated from respiratory samples in Spain. *Genome Announc.* **4**: e00083-16 (2016).
4. Smani, Y. et al. Platelet-activating factor receptor initiates contact of *Acinetobacter baumannii* expressing phosphorylcholine with host cells. *J. Biol. Chem.* **287**, 26901-26910 (2012).
5. Holloway, B.W. Genetic recombination in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Gen. Microbiol.* **13**, 572-581 (1955).
6. Peña, C. et al. Prospective multicenter study of the impact of carbapenem resistance on mortality in *Pseudomonas aeruginosa* bloodstream infections. *Antimicrob. Agents Chemother.* **56**, 1265-1272 (2012).
7. Boyle, V.J., Fancher M.E. & Ross, R.W. Jr. Rapid, modified Kirby-Bauer susceptibility test with single, high-concentration antimicrobial disks. *Antimicrob. Agents Chemother.* **3**, 418-424 (1973).

CAPÍTULO I. Artículo 1

Datos adicionales no publicados

1. Estudio del efecto del AOA-2 sobre la respuesta inmune innata y adaptativa.

1.1 Fundamento

Los resultados antes citados en el artículo 1 de esta Tesis Doctoral mostraron que el tratamiento con AOA-2 *in vivo* redujo la carga y la diseminación bacteriana en varios órganos, así como la bacteriemia, y aumentó la supervivencia animal, lo que permite plantear la hipótesis de que la disminución de las funciones bacterianas dependientes de la OmpA, tras su inhibición por AOA-2, molécula que no tiene actividad antibacteriana, permite controlar la infección a través de la respuesta inmune innata. Por ello, nos hemos interesado en el estudio del efecto de AOA-2 sobre la respuesta inmune innata y adaptativa.

1.2 Metodología

1.2.1 Cepas bacterianas

Se utilizó la cepa CS01, una cepa clínica de *A. baumannii* sensible a colistina (CMI 0,03 mg/L) aislada del líquido cefalorraquídeo de un paciente con meningitis antes del tratamiento con colistina (182).

1.2.2 Grupos de estudio

Se utilizó un modelo experimental de neumonía no letal.

- a) Control: animales a los que no se les administraron ningún tratamiento.
- b) CS01: animales a los que se les inocularon 8,4 log de UFC/ml de la cepa CS01 por vía intratraqueal.
- c) AOA-2: animales a los que se inyectaron el AOA-2 (10 mg/kg) 2 h por vía intraperitoneal.
- d) CS01+AOA-2: animales a los que se inyectaron el AOA-2 (10 mg/kg) 2 h tras la inoculación bacteriana de 8,4 log de UFC/ml de la cepa CS01 por vía intratraqueal.

1.2.3 Respuesta inmune innata

Grupos de 9 ratones se sacrificaron a las 2, 4, 8, 12 y 24 h. De cada animal se extrajo la sangre mediante un corte en el plexo periorbitario, y se centrifugaron a 4 °C durante 10 min a 3000 g para obtener el suero. Después, se midieron los niveles séricos de las citoquinas proinflamatorias interleucina-6 (IL-6), factor de necrosis tumoral alfa (TNF-

CAPÍTULO I. Artículo 1

α) e interleucina-1 β (IL-1 β) y la anti-inflamatoria interleucina-10 (IL-10), (R&D Systems, casa, España).

1.2.4 Respuesta inmune adaptativa

Grupos de 9 ratones fueron utilizados para los diferentes puntos temporales: 1, 3, 7, 14, y 30 días después de la administración del AOA-2. De cada animal se extrajo la sangre y el bazo (los esplenocitos). En cuanto al procesamiento, en ambas muestras se lisaron los glóbulos rojos con tampones específicos, se lavaron, se resuspendieron en un cóctel de superficie (tinción extracelular) usando los marcadores anti-CD4 (*PE rat anti-mouse clone GKI. 5*, BD Biosciences, España) y anti-CD8 (*PE-Ly 7 rat anti-mouse clone 53-6.7*, BD Biosciences, España) para linfocitos T, y anti-CD19 (*BV421 anti-mouse clone 6D5*, Biolegend, España) para los linfocitos B, el marcador de viabilidad celular (eFluor 780, Sigma-Aldrich, Spain). Después, se lavaron con un Buffer FIX/Wash compuesto de suero fetal bovino a 2%, PBS y azida de sodio a 0,1% y se resuspendieron con el cóctel de marcadores intracelulares (tinción intracelular): anti-IFN- γ (nombre del anticuerpo, casa, país) y anti-TNF α (FITC rat anti-mouse clone XMGI.2, Biolegend, España), y se fijaron para su análisis por citometría de flujo (BD FACSCantoTM II, BD Biosciences, Estados Unidos).

1.3 Resultados

1.3.1 Respuesta inmune innata

Para el estudio de la respuesta inmune innata, se midieron un grupo de citoquinas pro- y antiinflamatorias, TNF- α , IL-6, IL-1 β e IL-10, a diferentes puntos temporales: 0; 0,5; 1; 2; 6; 12 y 24 h. Para el grupo control sin infección se midieron solamente los puntos 0, 2 y 6 h, mientras que para el grupo de tratamiento con AOA-2 sin infección se midieron todos los puntos salvo el de 24 h. Para los otros dos grupos, grupo de infección sin y con tratamiento con AOA-2 se midieron todos los puntos temporales. Así pues, para el TNF- α , no hubo respuesta ni para el grupo control sin infección ni para el grupo de AOA-2 sin infección, siendo valores negativos en el ensayo, considerados como 0 pg/mL. Para el grupo de infección sin AOA-2, hubo respuesta a las 1, 2, 6 y 12 h, con valores de 79, 50, 126 y 37 pg/mL de TNF- α respectivamente, hasta descender a las 24 h a valores de 0 pg/mL. En el grupo de infección y tratado con AOA-2, hubo respuesta a las 1, 2, 6 y 12 h, con valores de 52, 38, 107 y 163 pg/mL de TNF- α respectivamente, para descender a las 24 h a valores de 0 pg/ml.

CAPÍTULO I. Artículo 1

En cuanto a la IL-6, no hubo respuesta tanto en el grupo control sin infección como en el grupo de AOA-2 sin infección a ninguno de los tiempos medidos. Para el grupo de infección sin AOA-2, hubo valores de respuesta a 2, 6 y 12 h, produciendo 2624, 5550 y 5806 pg/mL de IL-6 respectivamente, hasta bajar a 1196 pg/mL a las 24 h. Para el grupo de infección tratado con AOA-2 tuvo valores de respuesta a 2, 6 y 12 h, produciendo 3470, 3607 y 4795 pg/mL de IL-6, hasta bajar a 370 pg/mL a las 24 h.

Para la IL-1 β , los grupos de control sin infección y AOA-2 sin infección mostraron valores basales de 4 pg/mL en todos los puntos temporales, así como el grupo de infección sin tratamiento. Para el grupo de infección tratado con AOA-2, los niveles de IL-1 β se mantuvieron basales en 4 pg/mL, salvo un leve pico a las 12 h, con valores de 6,3 pg/ml de IL-1 β .

Por último, para la IL-10, tampoco hubo respuesta en los grupos control y el de AOA-2 sin infección. Para el grupo de infección sin AOA-2, el pico de respuesta, aunque leve, se dio a las 6 h siendo de 135 pg/mL de IL-10. Sin embargo, en el grupo infectado y tratado con AOA-2 el pico de respuesta se produjo a las 6 y 12 h, alcanzando valores de 160 y 597 pg/mL de IL-10 respectivamente.

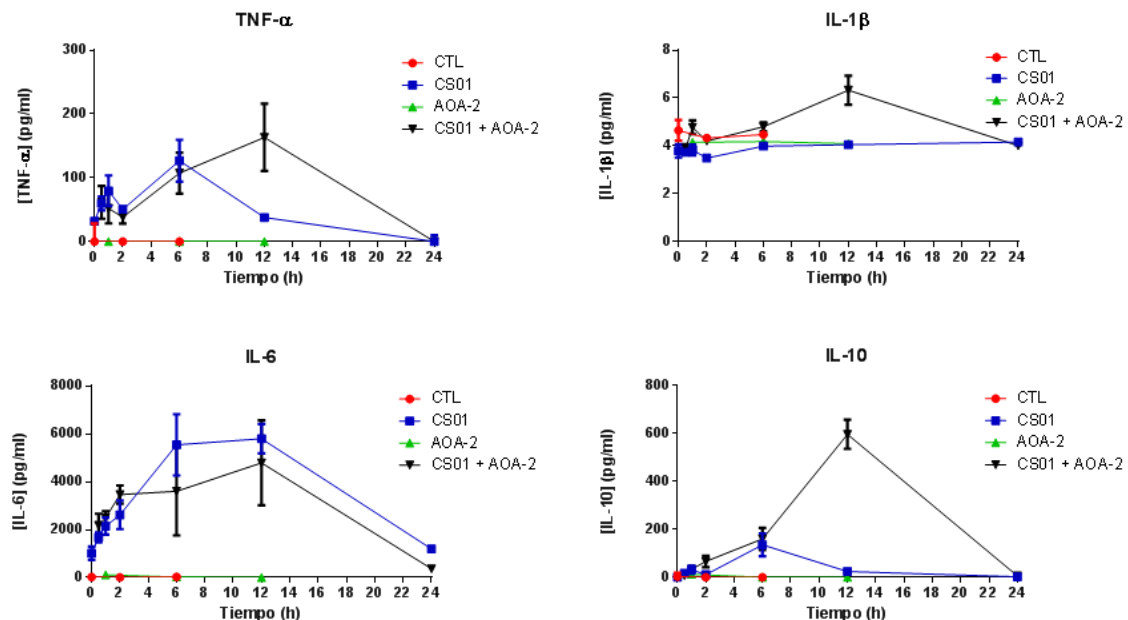


Figura A1. Efecto de AOA-2 sobre la producción de citocinas. Niveles de TNF- α , IL-6, IL-1 β , e IL-10 en suero determinados entre 0 y 24 horas en ratones controles, infectados con la cepa CS01 y tratados o no con AOA-2 (10 mg/kg). CTL: control.

CAPÍTULO I. Artículo 1

1.3.2 Respuesta inmune adaptativa

Se estudiaron las poblaciones de linfocitos B CD19+ así como los linfocitos T CD4+ y CD8+ tanto en sangre como en los tejidos del bazo y pulmón (Figura A2).

En referencia a la población de linfocitos B CD19+, el tratamiento de AOA-2 en animales sanos mantuvo la población de estas células entre el 40% y el 55% en bazo y sangre a lo largo de todos los puntos temporales de 1, 3, 7, 14 y 30 días, mientras que en pulmón la población de CD19+ era menor, siendo del 37% el día 1, para descender hasta el 7% y 12% en los días 14 y 30, respectivamente. Para el tratamiento de AOA-2 en ratones infectados con la cepa CS01, los linfocitos B CD19+ se mantuvieron en niveles altos, rodeando los 60%, en bazo, mientras que en pulmón fluctuaba; alcanzaba el 20% de CD19+ a los 3 días, pero descendía posteriormente al 9% a los 14 días, para aumentar hasta el 16% en el día 30. En sangre, al igual que en bazo, los niveles de CD19+ se mantenían entre el 40% y el 60% en todos los días.

En referencia a los linfocitos T CD4+, el tratamiento de AOA-2 en animales sanos mantuvo la población de estas células entre el 15% y el 22% en bazo y sangre a lo largo de todos los puntos temporales de 1, 3, 7, 14 y 30 días. Sin embargo, en pulmón la población de CD4+ era menor; el 9% en el día 1 hasta descender al 3% y 4% en los días 14 y 30, respectivamente. Para el tratamiento de AOA-2 en ratones infectados con la cepa CS01, los linfocitos T CD4+ se mantuvieron entre el 13% y 16% en bazo durante todos los días, mientras que en pulmón era menor y fluctuante; en el día 1 era del 10%, el día 3 descendían al 5%, aumentaba de nuevo al 10% en el día 14 y volvía a descender al 5% en el día 30. En sangre, la población de CD4+ descendían progresivamente a lo largo del tiempo; de un 21% el día 1 hasta un 10% el día 30.

Por último, en relación a los linfocitos T CD8+, el tratamiento de AOA-2 en ratones sanos mantuvo la población de estas células en bazo entre el 11% y 14% en todos los puntos temporales. En el pulmón, la población de CD8 era menor; un 6% el día 1, 7% el día 7, 5% el día 14 y un 3% en el día 30. En la sangre, esta población de CD8+ se mantenía entre el 11% y el 14%, al igual que en bazo, pero descendía el día 30 a un 9%. Para el tratamiento de AOA-2 en animales infectados con la cepa CS01, la población de linfocitos T CD8+ en bazo era del 13% durante los días 1 y 3 y descendía hasta el 9% los días 7, 14 y 30. En pulmón, había un 10% de CD8+ el día 1, y descendían hasta el 3% el día 14, para volver a aumentar al 5% el día 30. En sangre, se producía un descenso considerable de CD8+, del 21% el día 1 hasta el 9% el día 14, para posteriormente aumentar al 12% el día 30.

CAPÍTULO I. Artículo 1

Además, se estudió el ratio CD4⁺/CD8⁺ en el modelo experimental murino de neumonía en los diferentes tejidos en los diferentes grupos (Figura A3). En el bazo, los valores del ratio estaban por encima de 1 en todos los grupos de estudio y puntos temporales, si bien la tendencia a disminuir el ratio en el grupo de la infección sin tratamiento contrastaba con la tendencia en aumento en el grupo de animales infectados y tratados con AOA-2. En pulmón, el ratio más elevado se daba a los 14 días de la infección en el grupo de animales infectados y tratados con AOA-2, aunque este disminuía de nuevo a los 30 días de infección. Todos los demás valores de ratio se encontraban generalmente próximos a los del grupo control, que era entorno a 1. Los valores de ratio en sangre de los grupos infectado, tratado no infectado e infectado y tratado eran menores que el valor del grupo control, que se sitúa entorno a 3, salvo para el pico de valor que se produce a los 7 días en el grupo de animales infectados y no tratados, aunque posteriormente disminuye a valores por debajo de 2 en los siguientes puntos temporales.

CAPÍTULO I. Artículo 1

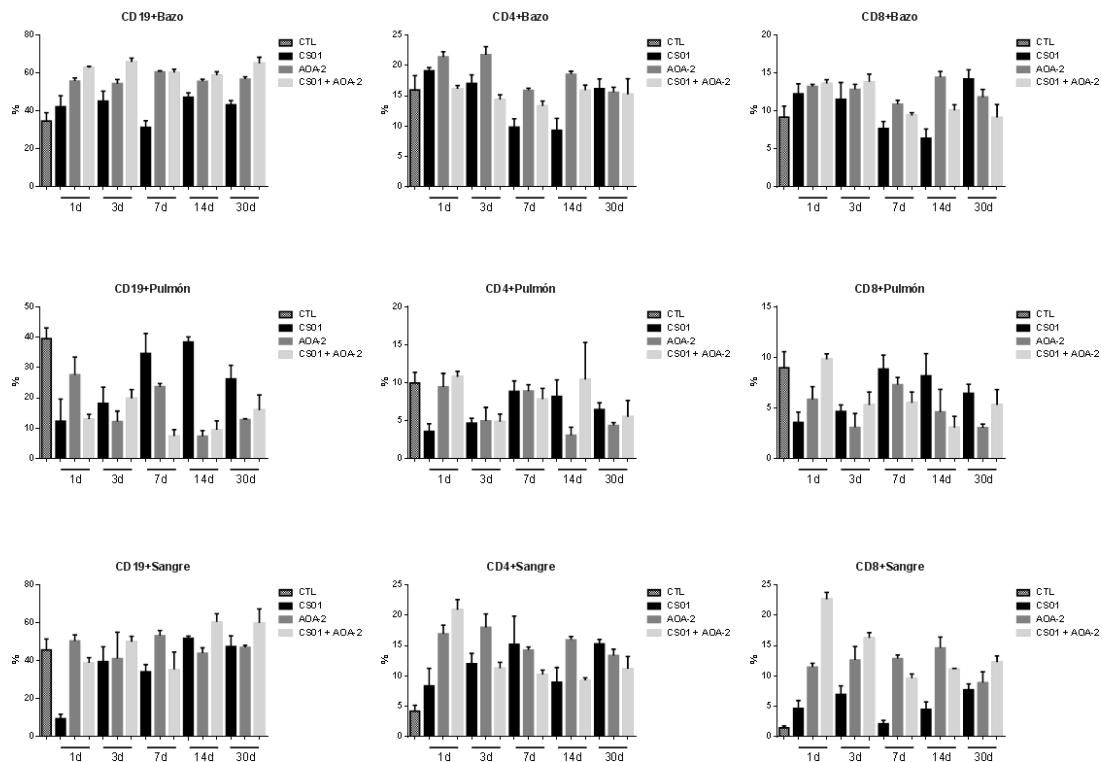


Figura A2. Efecto de AOA-2 sobre la respuesta inmune adaptativa. Poblaciones de los diferentes tipos celular CD19+, CD4+ y CD8+ en bazo, pulmón y sangre a diferentes puntos temporales.

CAPÍTULO I. Artículo 1

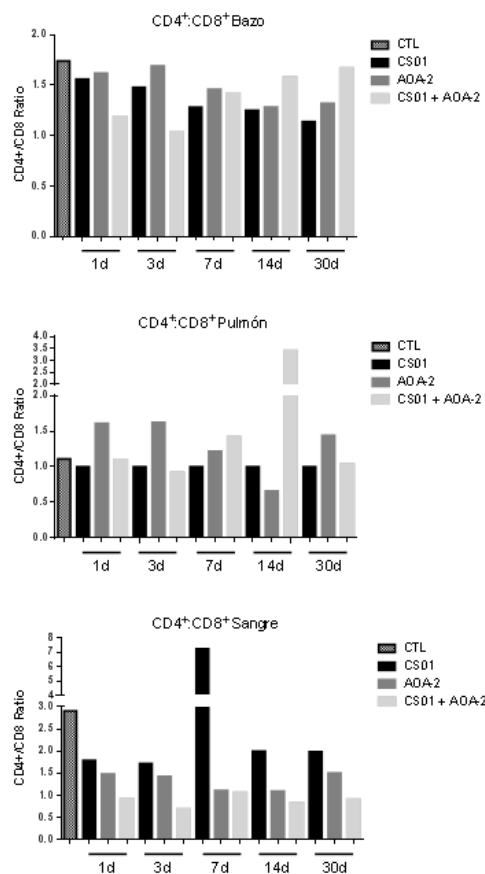


Figure A3. Ratio CD4+CD8+ en bazo, pulmón y sangre en los diferentes puntos temporales.

CAPÍTULO I. Artículo 2

1.2. Artículo 2. AOA-2 derivatives as outer membrane protein A inhibitors for treatment of Gram-negative bacilli infections.

El conocimiento de la patogénesis bacteriana ha hecho posible utilizar diferentes aproximaciones terapéuticas enfocadas a bloquear la virulencia de la bacteria. En este escenario, el bloqueo para prevenir la adhesión de patógenos a las células huésped se considera un enfoque innovador para combatir la infección de bacterias multirresistentes. En estudios previos, identificamos que un hexapéptido cíclico, el AOA-2, inhibía la interacción de BGN como *A. baumannii*, *P. aeruginosa* y *E. coli*, evitando así el desarrollo de infecciones tanto *in vitro* como en un modelo experimental de sepsis murina. Con estos resultados prometedores, se decidió llevar a cabo la síntesis de una librería de péptidos derivados del AOA-2, con el fin de mejorar la actividad presentada por este compuesto. De esta forma, se obtuvieron diez nuevos péptidos con diferentes cambios y características estructurales; desde un reposicionamiento de la molécula a cambios de aminoácidos, así como adiciones de radicales químicos con el fin de mejorar la solubilidad, o incluso algunos péptidos que mostraron mejor *score* que la molécula madre.

Como primer paso en la evaluación de estos compuestos, se demostró que ninguno de estos péptidos mostró citotoxicidad para las células A549. El efecto de estos derivados peptídicos y AOA-2 a 250, 125, 62,5 y 31,25 µg/mL en la unión de *A. baumannii* ATCC 17978, *P. aeruginosa* PAO1 y *E. coli* ATCC 25922 a las células A549 se caracterizó mediante los ensayos de adherencia bacteriana y de viabilidad celular. Tras un primer cribado se seleccionaron aquellos péptidos que habían reducido la adherencia bacteriana a las células A549 para los tres patógenos en estudio. Estos cuatro péptidos, RW01, RW02, RW03 y RW06 a 250 µg/mL redujeron la unión bacteriana a las células A549, respectivamente, a 80, 56, 53 y 28% (para la cepa ATCC 17978), a 40, 42, 20 y 31%. (para la cepa PAO1), y al 66, 61, 29 y 44% (para la cepa ATCC 25922). Además, dos de los cuatro péptidos, RW01 (para las tres cepas) y RW06 (para las cepas PAO1 y ATCC 25922) a 125, 62.5 y 31.25 µg / mL redujeron la unión bacteriana a las células A549 más que el péptido original AOA-2. A 31,25 µg/mL, RW01 redujo solo la unión de la cepa ATCC 17978 a células A549 cuando se comparó con AOA-2 (44 vs. 48%). Mientras tanto, RW01 y RW06, respectivamente, redujeron la unión bacteriana a células A549 en comparación con AOA-2 (50 y 46% frente a 87%, para la cepa PAO1 y 64 y 72% frente a 82%, para la cepa ATCC 25922).

CAPÍTULO I. Artículo 2

Con respecto a los resultados de citotoxicidad, RW01 y RW06 a 125 µg/mL aumentaron la viabilidad de las células A549 en presencia de *A. baumannii* ATCC 17978 o *P. aeruginosa* PAO1, y en menor medida sólo RW01 aumentó la viabilidad de las células A549 en presencia de *E. coli* ATCC 25922.

En resumen, el proceso de optimización de AOA-2 ha generado dos derivados con resultados *in vitro* que pueden considerarse prometedores. No obstante, son necesarios estudios *in vivo* que puedan, por un lado, respaldar estos resultados *in vitro* y, por otro lado, evaluar la eficacia terapéutica de ambos compuestos en monoterapia y en combinación con antibióticos clínicamente relevantes en infecciones graves por estos BGN.

Este trabajo está pendiente de enviar para publicación a la revista *Journal of Antimicrobial and Chemotherapy*.

CAPÍTULO I. Artículo 2

Title. AOA-2 derivatives as outer membrane protein A inhibitors for treatment of Gram-negative bacilli infections.

Abstract

Preventing the adhesion of pathogens to host cells provides an innovative approach to tackling MDR bacteria. In this regard, the identification of outer membrane protein A (OmpA) as a key bacterial virulence factor has been a major breakthrough. Previously, we identified that a cyclic hexapeptide AOA-2 inhibited the interaction of Gram-negative bacilli (GNB) like *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli* to host cells thereby preventing the development of infection *in vitro* and in a murine sepsis peritoneal model. In this work, we aimed to evaluate *in vitro* a library of AOA-2 derivatives in order to improve the effect of AOA-2 against GNB infections.

Ten AOA-2 derivatives were synthesized for the *in vitro* assays. Their toxicities to human lung epithelial cells (A549 cells) for 24 h were evaluated by determining the A549 cells viability using 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide assay. The effect of these peptide derivatives and AOA-2 at 250, 125, 62.5 and 31.25 µg/mL on the attachment of *A. baumannii* ATCC 17978, *P. aeruginosa* PAO1 and *E. coli* ATCC 25922 strains to A549 cells was characterized by adherence and viability assays.

None of the ten derivatives showed toxicity to A549 cells. Four of them, RW01, RW02, RW03 and RW06 at 250 µg/mL reduced the bacterial attachment to A549 cells, respectively to 80, 56, 53 and 28% (for ATCC 17978 strain), to 40, 42, 20 and 31% (for PAO1 strain), and to 66, 61, 29 and 44% (for ATCC 25922 strain). Two of the four peptides, RW01 (for the three strains) and RW06, (for PAO1 and ATCC 25922 strains)

CAPÍTULO I. Artículo 2

at 125, 62.5 and 31.25 µg/mL reduced the bacterial attachment to A549 cells more than the parent peptide AOA-2. At 31.25 µg/mL RW01 reduced only the attachment of ATCC 17978 strain to A549 cells when compared with AOA-2 (44 vs. 48%). Meanwhile RW01 and RW06, respectively, reduced the bacterial attachment to A549 cells when compared with AOA-2 (50 and 46% vs. 87%, for PAO1 strain), and (64 and 72% vs. 82%, for ATCC 25922 strain). Regarding the cytotoxicity, RW01 and RW06 at 125 µg/mL increased the viability of A549 cells in presence of *A. baumannii* ATCC 17978 or *P. aeruginosa* PAO1.

The optimization program of AOA-2 has generated two derivatives (RW01 and RW06) with best effect against interaction of GNB with host cells. Both compounds have improved in vitro the effect of AOA-2 against GNB infections.

Keywords

AOA-2 derivatives; outer membrane protein A; inhibitor; Gram-negative bacilli

CAPÍTULO I. Artículo 2

1. Introduction

Multidrug resistance (MDR) in Gram-negative bacilli (GNB) is a current threat in global health that requires effective and urgent solutions, being a global priority for WHO (1). The success of GNB as a community and nosocomial pathogen is attributed to its resistant to several antibiotic families. Whole-genome sequencing studies involving the GNB have demonstrated not only a vast array of antibiotic drug resistance determinants but also many pathogenicity islands (2, 3).

Studies of specific virulence mechanisms have demonstrated the contribution of outer membrane protein A (OmpA), as well as pili, fimbriae, outer membrane proteins and various secretion systems in the pathogenesis of GNB *in vitro* and in animal experimental models (3-10).

Previous studies showed that *A. baumannii* and *E. coli* deficient in ompA reduced their pathogenicities *in vitro* and *in vivo* (5, 10). Interestingly, we showed that the inhibition of OmpA by a cyclic hexapeptide AOA-2 reduces bacterial dissemination between organs, development of pneumonia and bacteremia and death in murine peritoneal sepsis model by *A. baumannii*, *P. aeruginosa* and *E. coli* (11). Moreover, AOA-2 has showed *in vitro* synergy with colistin and combination has showed good therapeutic efficacy in combination with colistin against colistin-susceptible and resistant *A. baumannii* through the overexpression of Omp25 (12).

In the present study, we aimed to improve the efficacy of AOA-2 against GNB infections by optimizing the derivatives of AOA-2.

2. Materials and methods

2.1 Materials for the synthesis of peptides

CAPÍTULO I. Artículo 2

The protected amino acids and resins were supplied by Luxembourg Industries (Tel-Aviv, Israel), Neosystem (Strasbourg, France), Calbiochem-Novabiochem AG (Läufelfingen, Switzerland), PolyPeptides Labs (Torrance, CA, USA), Bachem AG (Bubendorf, Switzerland), and Iris Biotech (Marktredwitz, Germany). PyBOP was provided by Calbiochem-Novabiochem AG. Piperidine is obtained from SDS (Peypin, France); N, N-diisopropylethylamine (DIEA) was obtained from Merck (Darmstadt, Germany) and triisopropylsilane (TIS) and ninhydrin were from Fluka Chemika (Buchs, Switzerland). HOAt was acquired from GL Biochem Shanghai Ltd. (Shanghai, China). Solvents for the synthesis of peptides and RP-HPLC (dimethylformamide (DMF), dichloromethane (DCM) and acetonitrile (MeCN)) were from Scharlau or SDS (Barcelona, Spain). Trifluoroacetic acid (TFA) was purchased from Kali Chemie (Bad Wimpfen, Germany). The other chemicals used were from Aldrich (Milwaukee, WI USA) and were of the highest commercially available purity.

2.2 Synthesis of peptides

The peptides were synthesized on a 2-Chlorotriethyl chloride resin by solid phase peptide synthesis using the 9-fluorenylmethoxycarbonyl/tert-butyl (tBu Fmoc) strategy. The amino acids protected with N α -Fmoc (3 eq)/HOAt (3 eq), PyBOP (4 eq) and DIEA (6 eq) were used for the couplings. The Fmoc protecting group was removed by treatment with a 20% piperidine solution in DMF. The peptides were cleaved using 2% TFA in DCM. For the cyclization step, the solvent used was DCM/DMF (98:2), PyAOP (2 eq) was dissolved in DMF and the peptide (5 mM) in DCM and once mixed in the appropriate proportions, 6 eq of DIEA was added, the reaction was completed in 2 or 3 h. After the cyclization carried out, deprotection of the side chains was carried out by TFA/TIS/H₂O (95:2.5:2.5). Peptides were analyzed at λ =220 nm by HPLC [Waters

CAPÍTULO I. Artículo 2

Alliance 2695 separation module equipped with a 2998 photodiode array detector, Sunfire C18 column (100 mm x 4.6 mm x 3.5 mm, 100 Å, Waters)], and Empower software; flow rate=1 ml/min. Peptides were then purified by semi-preparative HPLC [Waters 2700 Sample Manager equipped with a double absorbance detector λ Waters 2487, a Waters 600 controller, a Waters fraction collection II, a Symmetry C18 column (100 mm x 30 mm, 5 mm, 100 Å, Waters) and the Millennium chromatography manager software]. Flow rate=15 mL/min; solvents: A=0.1% trifluoroacetic acid in water, and B=0.05% trifluoroacetic acid in acetonitrile. Peptides are characterized by MALDI-TOF mass spectrometry (Voyager-DE RP MALDI-TOF, PE Biosystems with a N₂-laser of 337 nm) and a high-resolution ESI-MS model (LTQ-FT Ultra, Thermo Scientific).

2.3 Bacterial strains

Three reference bacterial strains were used: a) *A. baumannii* ATCC 17978 (13), b) *P. aeruginosa* PAO1 (14) and c) *E. coli* ATCC 25922 (15).

2.4 Cell culture and infection

The human pneumocyte cell line type II A549, derived from a human lung carcinoma, obtained from the American Type Culture Collection (LGC, United Kingdom) was used and cultured in DMEM medium (Invitrogen, Spain) supplemented with 10% of heat-inactivated fetal bovine serum, 50 µg/mL vancomycin (Laboratorios Normon, Spain), 20 µg/mL gentamicin (Normon Laboratories, Spain), 0.25 µg/ amphotericin B mL (Invitrogen, Spain) and 1% HEPES (Invitrogen, Spain) in a humidified incubator, 5% CO₂ at 37 °C. Routine passage of A549 cells was performed every 3-4 days. Cells were seeded 24 h in 96-well plates (Sarstedt, Germany) for the cell viability assay, and in 24-well plates (Sarstedt, Germany) for the bacterial adhesion assays.

2.5 Cell viability assay

2.5.1 *In vitro* toxicity of peptides

A549 cells were incubated with the peptide derivatives RW01, RW02, RW03, RW06, RW07, RW08, RW09, RW10, RW11 and RW13 (0, 3.5, 7, 15, 35, 62, 125, 250 and 500 µg/mL) for 24 h with 5% CO₂ at 37 °C. Prior the evaluation of the peptides cytotoxicity, A549 cells were washed three times with prewarmed PBS 1X. Subsequently, quantitative cytotoxicity was evaluated by measuring the mitochondrial reduction activity using the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay as described (16). The percentage of cytotoxicity was calculated from the absorbance at 570 nm as follow: [(Absorbance 570 nm of treated cells/Absorbance 570 nm mean of untreated cells) x 100].

2.5.2 Bacterial cytotoxicity

A549 cells were infected with 10⁸ CFU/mL of *A. baumannii* ATCC 17978, *P. aeruginosa* PAO1 and *E. coli* ATCC 25922 strains pretreated with AOA-2 or the derivatives RW01, RW02, RW03, RW06, RW07, RW08, RW09, RW10, RW11 and RW13 (31.25, 62.5 and 125 µg/mL, 30 min) for 24 h with 5% CO₂ at 37 °C. Prior to the evaluation of bacterial cytotoxicity, viable bacteria are first removed from A549 cell culture by washing these A549 cells five times with PBS 1X. Subsequently, cell viability was evaluated as described above.

2.6 Bacterial adhesion assay

A. baumannii ATCC 17978, *P. aeruginosa* PAO1 and *E. coli* ATCC 25922 strains were incubated with AOA-2 or the derivatives RW01, RW02, RW03, RW06, RW07, RW08,

CAPÍTULO I. Artículo 2

RW09, RW10, RW11 and RW13 (31.25, 62.5, 125 and 250 µg/mL, 30 min) and added to the A549 cells for 2 h at 5% CO₂ and 37 °C. Subsequently, infected A549 cells were washed five times with prewarmed PBS 1X and lysed with 0.5% Triton X-100. Serial dilutions of these lysates were made and plated on blood agar plates (Blood-Agar Columbia, Becton Dickinson Microbiology Systems, USA) and incubated at 37 °C for 24 h for colony counting and then determination of CFU/mL that attached to A549 cells.

2.7 Statistical analysis

Group data are presented as mean \pm SEM. Student *t*-test was used to determine differences between means. Differences were considered significant at $P < 0.05$. The SPSS (version 23.0) statistical package was used (SPSS Inc.).

3. Results

3.1 AOA-2 derivatives synthesis

The optimization of the AOA-2 peptide was carried out through an iterative computational design process. This computational design was based on the use of docking techniques with flexible side chains and molecular dynamics, using the data on the interaction of AOA-2 and OmpA detailed above in article 1 of this chapter as experimental restriction. Previously, an exhaustive exploration of its accessible conformational space was made for each molecule. All the interaction calculations were carried out thanks to the access of the "Mare Nostrum" supercomputer of the "Barcelona Supercomputer Center" (BSC). Thus, a total of ten peptides derived from the lead compound, AOA-2 were synthesized (Table 1).

CAPÍTULO I. Artículo 2

Different changes were carried out to optimize the lead compound. In RW01 solubility was enhanced by the addition of NH₂ group. In RW02 and RW03 tryptophan analogs (3Pal: beta-(3-pyridyl)-alanine, and 2Nal: beta-(2-naphtyl)-alanine) were added. In RW06 and RW07 arginine analogs (Dab: 2,4-Diaminobutanoic acid, and lysine) were added. In RW08 and RW09 a repositioning of the hit sequence were made. The remaining peptides RW10, RW11 and RW13 showed a higher docking score than the AOA-2 peptide (Table 1 and figure 1).

3.2 *In vitro* toxicity of AOA-2 derivatives

The study of the toxicity of the synthesized compounds was carried out. The percentage of cell viability on the A549 epithelial cells incubated for 24 h with the different peptides at decreasing concentrations was determined from 500 µg/mL to 3.5 µg/mL. None of the studied compounds showed cytotoxicity at the different concentrations used, being the cellular viability between 94 and 100 % (Table 2).

3.3 *In vitro* effect of AOA-2 derivatives on *A. baumannii*, *P. aeruginosa*, *E. coli* interaction with host cells

3.3.1 Bacterial adhesion assay

An initial stage of screening of the effect of all peptide derivatives on adherence of *A. baumannii* ATCC 17978, *P. aeruginosa* PAO1 and *E. coli* ATCC 25922 to host cells was carried out. First we showed that RW01, RW02, RW03 and RW06 at 250 µg/mL reduced the bacterial adherence against *A. baumannii* to 26.18, 43.58, 55.47 and 32.83% respectively, against *P. aeruginosa* to 40.08, 42.51, 20.71 and 31.14% respectively and against *E. coli* to 66.66, 61.11, 29.62 and 44.44% respectively. Moreover, RW07 and RW13 reduced also the bacterial adherence against *P. aeruginosa* to 68.38% and

CAPÍTULO I. Artículo 2

43.46%, respectively, and against *E. coli* to 88.88 and 55.55%, respectively, but not against *A. baumannii*. In the case of RW08, bacterial adherence against *A. baumannii* and *P. aeruginosa* was reduced to 75.00 and 33.34%, respectively, but not against *E. coli*; whereas RW09, RW10 and RW11 reduced bacterial adherence only against *P. aeruginosa* at 35.34, 57.14 and 70.27% respectively, but not against *A. baumannii* and *E. coli* (Figure 2).

In summary, four of the ten peptides derived from AOA-2, RW01, RW02, RW03 and RW06 have reduced the adherence of the three pathogens to host cells (Table 3). These four derivatives were selected for the following studies, in which the reduction of bacterial adherence was studied again but at decreasing concentrations of these peptides: 250; 125; 62.5 and 31.25 µg/mL, and compared with those of AOA-2.

For *A. baumannii*, RW01 and RW06 at 250 µg/mL have reduced the adherence of ATCC 17978 to A549 cells to 26.18 and 32.83%, respectively vs. the the 36.62% observed by AOA-2. Also RW01 and RW06 at 62.5 µg/mL have reduced the adherence of ATCC 17978 to 38.42 and 41.52%, respectively, while AOA-2 at the same concentration has reduced only to 44.43% (Figure 3A).

For *P. aeruginosa*, the four peptides RW01, RW02, RW03 and RW04 improved the results of AOA-2; for example, at 250 µg/mL they reduced the adherence of PAO1 to 40.08, 49.23, 20.71 and 31.14% respectively, while AOA-2 at this concentration only reduced the adhesion to 84.47%. For the other concentrations, only RW01, RW03 and RW06 improved the adhesion reduction with respect to AOA-2 (Figure 3B).

For *E. coli*, RW01, RW03 and RW06 reduced the adherence of ATCC 25922 to A549 cells more than with AOA-2; for example, at 125 µg/mL they reduced this adherence to 55.62, 49.52 and 44.58%, respectively, while AOA-2 at the same concentration only reduced the adhesion to 70.73% (Figure 3C).

CAPÍTULO I. Artículo 2

To summarize, RW01 and RW06 were selected as the peptides with the greatest spectrum of activity against GNB, due to their effect on bacterial adhesion when compared to the lead compound AOA-2 (Figure 4).

3.3.2 Cell viability assay

The effect of RW01 and RW06 on cell viability in infected A549 cells was explored. Cell survival assessment by MTT assay showed that for *A. baumannii* treatment with RW01 at 125; 62.5 and 31.25 µg/mL increased the cell viability to 83.56, 75.12 and 72.60%, whereas cell viability of infected cells without treatment with RW01 was 70.32%. The treatment with RW06 at the same concentrations increased cell viability to 86.96, 80.18 and 77.30%, respectively. For *P. aeruginosa*, treatment with RW01 at 125, 62.5 and 31.25 µg/mL increased the cell viability to 87.13, 84.34 and 75.69%, whereas cell viability of infected cells without treatment with RW01 was 67.27%. The treatment with RW06 at the same concentrations increased cell viability to 84.26; 73.85 and 72.28%, respectively. For *E. coli*, treatment with RW01 at concentrations of 125; 62.5 and 31.25 µg/mL increased the cell viability to 29.21, 24.32 and 23.08%, whereas cell viability of infected cells without treatment with RW01 was 16.50%. The treatment with RW06 at the same concentrations increased the cell viability to 22.97, 17.05 and 17.77% (Figure 5).

4. Discussion

Nowadays the threat of antibiotic resistance requires a multiple approach that includes better administration of known antibiotics and the development of new alternative strategies to treat or prevent bacterial infections.

CAPÍTULO I. Artículo 2

This study focuses on the paradigm of interference in pathogenesis, that is, disarming pathogenic bacteria by neutralizing their virulence factors (17). It was already demonstrated that a cyclic hexapeptide, AOA-2, was able to inhibit the interaction of GNB with host cells and consequently increased the viability of these host cells (11). At the same time, *in vivo* administration of this compound showed a large decrease in bacterial load in tissues as well as a reduction in bacteremia, together with a significant decrease in mice mortality, especially in *A. baumannii*. In this scenario, the drug discovery, such as AOA-2, should be considered as an initial stage for the development of a new class of agents with anti-virulence capacity, like other studies that are currently in preclinical stages of development, such as the compound M64 developed against the virulence factor MvfR of *P. aeruginosa* (18) or the compound 22, a byarilmannoside, against the FimK of uropathogenic *E. coli* (19, 20).

The therapeutic efficacy of these virulence factors should also be further evaluated in combination with antimicrobial agents used in the clinical setting. For example, AOA-2 has presented good therapeutic efficacy when combined with colistin in murine peritoneal sepsis model by colistin-resistant *A. baumannii* (12). Taking into account this approach as an adjuvant to antibiotic treatment, it is also necessary to optimize this peptide in order to develop a new library of compounds that improve the efficacy of the lead compound AOA-2.

A number of peptides with biological activity, particularly in the field of antibacterial research, have led to new classes of antibacterial drugs (21). On the basis of the fact that AOA-2 has previously proved its utility as an effective source of anti-virulence compound with specific mechanism of action (11), we have maintained this backbone as the fundamental core in our new derivatives. Three main points of variation have been considered: [1] increasing of peptide solubility by NH₂ addition, [2] substituting

CAPÍTULO I. Artículo 2

tryptophan and arginine by their analogs, [3] and repositioning the general structure of AOA-2.

All these derivatives did not show toxicities in human lungs epithelial cells. Similarly, the lead compound AOA-2 did not show toxicity in these host cells (11). This data confirm that the variation made in the AOA-2 structure did not affect the viability of host cells.

Bacterial adherence assays were employed to screen the efficacy of these derivatives. Through a various screening steps, two derivatives RW01 (solubility enhancer: NH₂) and RW06 (analog of arginine: 2,4-Diaminobutanoic acid) have showed extended spectrum effect on the bacterial adherence to human lung epithelial cells and have been selected for the rest of the experiments. Whereas other tryptohan (3Pal: beta-(3-pyridyl)-alanine, and 2Nal: beta-(2-naphtyl)-alanine) and arginine (lysine) analogs or amino acids repositioning in the lead coumpound have showed short spectrum effect. This could be explained by the fact that these derivatives did not binded equally to OmpA and its homolgous of the all studied GNB, due to difference in the homology of OmpA sequence. Of note, OmpA of *A. baumannii* present a 58% of homology with OmpA of *E. coli* and its homologous in *P. aeruginosa* (22).

Interestingly, RW01 and RW06 have prevented significantly the death of human lung epithelial cells caused by *A. baumannii* and *P. aeruginosa*, and with lesser effect against *E. coli*. These results are consistent with previous observations that the lead compound AOA-2 prevents more the cell death caused by *A. baumannii* and *P. aeruginosa* than by *E. coli* (11). The failure of both derivatives against *E. coli* may be attributable to the presence of other highly virulent factors circumventing the loss of OmpA (23).

In summary, the optimization program of AOA-2 has generated two derivatives with *in vitro* promising results. *In vivo* studies are necessary to support these *in vitro* results and

CAPÍTULO I. Artículo 2

to evaluate the therapeutic efficacy of both derivatives in monotherapy and in combination with clinically relevant antibiotics in severe infections by these GNB.

Fundings: This study was supported by the Instituto de Salud Carlos III, Proyectos de Investigación en Salud (grants PI15/01358 and PI16/01378) and by Plan Nacional de I+D+i 2013-2016 and Instituto de Salud Carlos III, Subdirección General de Redes y Centros de Investigación Cooperativa, Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades, Spanish Network for Research in Infectious Diseases (REIPI RD16/0016/0009) - co- financed by European Development Regional Fund “A way to achieve Europe”, Operative program Intelligent Growth 2014-2020. Younes Smani is supported by the Subprograma Miguel Servet Tipo I from the Ministerio de Economía y Competitividad of Spain (CP15/01358).

Competing Interests: No conflicts of interest to declare.

References

1. Tacconelli E, Carrara E, Savoldi A, Harbarth S, Mendelson M, Monnet DL, et al. Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. *Lancet Infect Dis* 2018;18:318-27.
2. Kaper JB, Nataro JP, Mobley HL. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat Rev Microbiol* 2004;2:123-40.
3. Smith MG, Gianoulis TA, Pukatzki S, Mekalanos JJ, Ornston LN, Gerstein M. New insights into *Acinetobacter baumannii* pathogenesis revealed by high-density pyrosequencing and transposon mutagenesis. *Genes Dev* 2007;21:601-14.
4. Weiser JN, Gotschlich EC. Outer membrane protein A (OmpA) contributes to serum resistance and pathogenicity of *Escherichia coli* K-1. *Infect Immun* 1991;59:2252-8.

CAPÍTULO I. Artículo 2

5. Mittal R, Krishnan S, González-Gómez I, Prasadarao NV. Deciphering the roles of outer membrane protein and extracellular loops in the pathogenesis of *Escherichia coli* K1 meningitis. J Biol Chem 2011;286:2183-93.
6. Wu H, Kuzmenko A, Wan S, Schaffer L, Weiss A, Fisher JH, et al. Surfactant proteins A and D inhibit the growth of Gram-negative bacteria by increasing membrane permeability. J Clin Invest 2003;111:1589-602.
7. Nicholson TF, Watts KM, Hunstad DA. OmpA of uropathogenic *Escherichia coli* promotes postinvasion pathogenesis of cystitis. Infect Immun 2019;77:5245-51.
8. Prasadarao NV, Wass CA, Weiser JN, Stins MF, Huang SH, Kim KS. Outer membrane protein A of *Escherichia coli* contributes to invasion of brain microvascular endothelial cells. Infect Immun 1996;64:146-53.
9. Teng CH, Xie Y, Shin S, Di Cello F, Paul-Satyaseela M, Cai M, et al. Effects of ompA deletion on expression of type 1 fimbriae in *Escherichia coli* K1 strain RS218 and on the association of *E. coli* with human brain microvascular endothelial cells. Infect Immun 2006;74:5609-16.
10. Sánchez-Encinales V, Álvarez-Marín R, Pachón-Ibáñez ME, Fernández-Cuenca F, Pascual A, Garnacho-Montero J, et al. Overproduction of Outer Membrane Protein A by *Acinetobacter baumannii* as a risk factor for nosocomial pneumonia, bacteremia, and mortality rate increase. J Infect Dis 2017;215:966-74.
11. Vila-Farrés X, Parra-Millán R, Sánchez-Encinales V, Varese M, Ayerbe-Algaba R, Bayó N, et al. Combating virulence of Gram-negative bacilli by OmpA inhibition. Sci Rep 2017;7:14683.
12. Parra-Millán R, Vila-Farrés X, Ayerbe-Algaba R, Varese M, Sánchez-Encinales V, Bayó N. Synergistic activity of an OmpA inhibitor and colistin against colistin-resistant *Acinetobacter baumannii*: mechanistic analysis and *in vivo* efficacy. J Antimicrob Chemother 2018;73:3405-412.
13. Baumann P, Doudoroff M, Stanier RY. A study of the *Moraxella* group. II. Oxidative-negative species (genus *Acinetobacter*). J Bacteriol 1968;95:1520-41.

CAPÍTULO I. Artículo 2

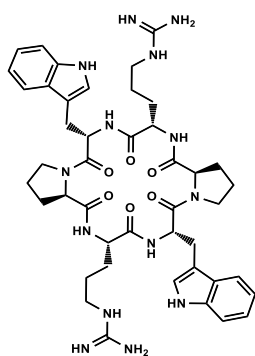
14. Holloway IW. Genetic recombination in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Gen Microbial* 1955;13:572-681.
15. Reading C, Cole M. Clavulanic acid: a beta-lactamase-inhibiting beta-lactam from *Streptomyces clavuligerus*. *Antimicrob Agents Chemother* 1977;11:852-7.
16. Smani Y, Dominguez-Herrera J, and Pachón J. Association of the outer membrane protein Omp33 with fitness and virulence of *Acinetobacter baumannii*. *J Infect Dis* 2013;208,1561-70.
17. Dickey SW, Cheung GYC, Otto M. Different drugs for bad bugs: antivirulence strategies in the age of antibiotic resistance. *Nat Rev Drug Discov* 2017;16:457-71.
18. Starkey M, Lepine F, Maura D, Bandyopadhyaya A, Lesic B, He J, et al. Identification of anti-virulence compounds that disrupt quorum-sensing regulated acute and persistent pathogenicity. *PLoS Pathog* 2014;10:e1004321.
19. Jarvis C, Han Z, Kalas V, Klein R, Pinkner JS, Ford B, et al. Antivirulence isoquinolone mannosides: optimization of the biaryl aglycone for FimH lectin binding affinity and efficacy in the treatment of chronic UTI. *Chem Med Chem* 2016;11:367-73.
20. Cusumano CK, Pinkner JS, Han Z, Greene SE, Ford BA, Crowley JR, et al. Treatment and prevention of urinary tract infection with orally active FimH inhibitors. *Sci Transl Med* 2011;3:109-15.
21. Gordon YJ, Romanowski EG, McDermott AM. A review of antimicrobial peptides and their therapeutic potential as anti-infective drugs. *Curr Eye Res* 2005;30:505-15.
22. Gribun A, Nitzan Y, Pechatnikov I, HersHKovits G, Katcoff DJ. Molecular and structural characterization of the HMP-AB gene encoding a pore-forming protein from a clinical isolate of *Acinetobacter baumannii*. *Curr Microbiol* 2003;47:434-43.
23. Nielubowicz GR, Mobley HL. Host-pathogen interactions in urinary tract infection. *Nat Rev Urol* 2010;7:430-41.

CAPÍTULO I. Artículo 2

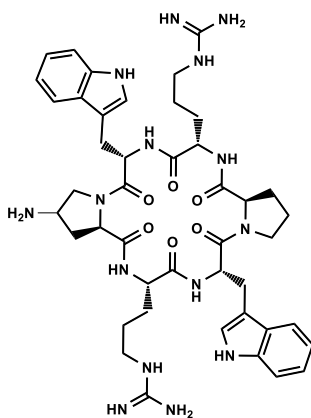
Table 1. Peptide sequences of the AOA-2 derivatives.

Peptides	Sequence	Rational
AOA-2	&Trp-D-Pro-Arg-Trp-D-Pro-Arg&	Hit compound
RW01	&Trp-(NH ₂) D-Pro-Arg-Trp-D-Pro-Arg&	Solubility enhancer
RW02	&3Pal-D-Pro-Arg-3Pal-D-Pro-Arg&	Analogs of Tryptophan
RW03	&2Nal-D-Pro-Arg-2Nal-D-Pro-Arg&	Analogs of Tryptophan
RW06	&Trp-D-Pro-Dab-Trp-D-Pro-Dab&	Analogs of Arginine
RW07	&Trp-D-Pro-Lys-Trp-D-Pro-Lys&	Analogs of Arginine
RW08	&Arg-D-Pro-Trp-Trp-D-Pro-Arg&	Repositioning
RW09	&Trp-D-Pro-Trp-Arg-D-Pro-Arg&	Repositioning
RW10	&Tyr-D-Pro-Ala-Tyr-D-Pro-Ala&	Higher score
RW11	&2Nal-D-Pro-Arg-3Pal-D-Pro-Arg&	Higher score
RW13	&3Pal-D-Pro-Arg-Trp-D-Pro-Tyr&	Higher score

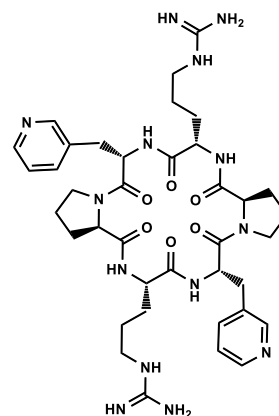
CAPÍTULO I. Artículo 2



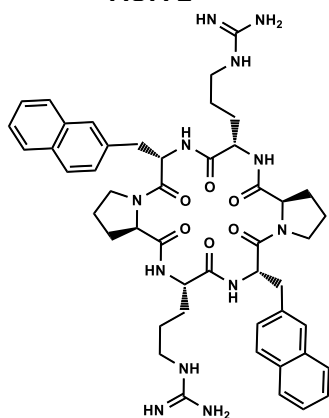
AOA-2



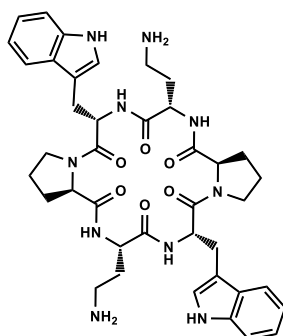
RW01



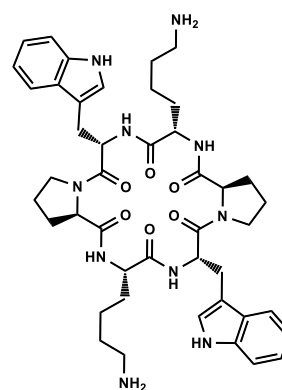
RW02



RW03



RW06



RW07

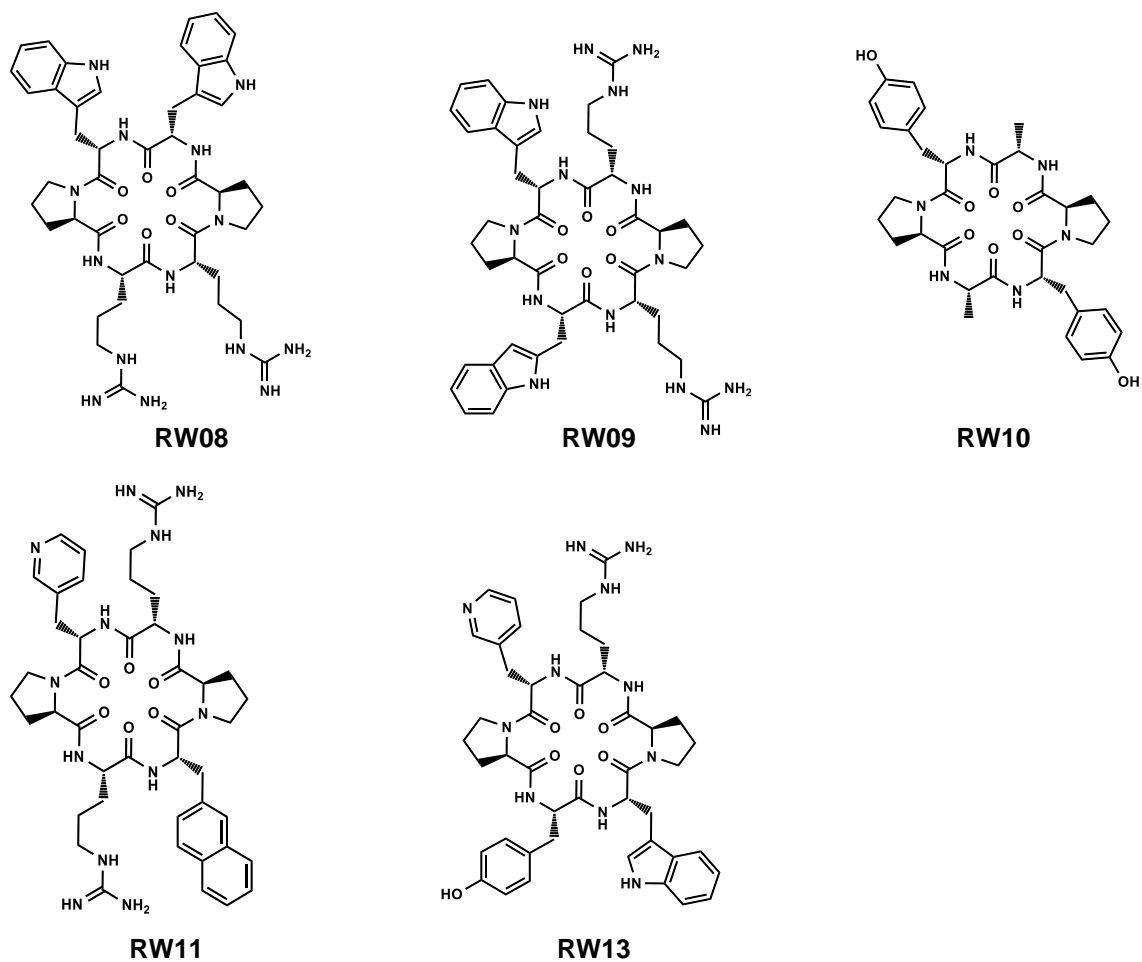


Figure 1. Structure of AOA-2 and its optimized derivatives.

CAPÍTULO I. Artículo 2

Table 2. Percentages of A549 cellular toxicity assessed through mitochondrial reduction activity (MTT assay) in presence AOA-2 derivatives. Data expressed as a percentage of cell viability.

	Concentration ($\mu\text{g/mL}$)							
	500	250	125	62	35	15	7	3.5
RW01	94.87 \pm 0.13	108.83 \pm 0.06	111.85 \pm 0.05	106.09 \pm 0.09	100.37 \pm 0.3	104.69 \pm 0.07	109.59 \pm 0.09	105.67 \pm 0.05
RW02	94.24 \pm 0.09	112.64 \pm 0.37	103.7 \pm 0.23	106.81 \pm 0.13	103.94 \pm 0.15	111.2 \pm 0.03	97.03 \pm 0.17	100.71 \pm 0.15
RW03	98.11 \pm 0.17	103.63 \pm 0.02	104.08 \pm 0.01	104.22 \pm 0.04	105.94 \pm 0.02	106.36 \pm 0.02	106.2 \pm 0.02	104.09 \pm 0.04
RW06	99.43 \pm 0.04	101.27 \pm 0.07	104.19 \pm 0.31	106.99 \pm 0.12	97.37 \pm 0.2	97.07 \pm 0.19	101.25 \pm 0.19	107.96 \pm 0.1
RW07	96.23 \pm 0.12	106.63 \pm 0.01	111.19 \pm 0.05	110.77 \pm 0.02	107.79 \pm 0.08	100.48 \pm 0.1	105.06 \pm 0.13	105.42 \pm 0.14
RW08	101.38 \pm 0.25	114.12 \pm 0.02	109.65 \pm 0.04	109.45 \pm 0.11	110.76 \pm 0.011	112.89 \pm 0.04	108.05 \pm 0.06	111.3 \pm 0.07
RW09	98.5 \pm 0.23	111.06 \pm 0.03	111.52 \pm 0.08	104.59 \pm 0.16	113.75 \pm 0.05	103.12 \pm 0.1	104.86 \pm 0.13	102.44 \pm 0.1
RW10	97.88 \pm 0.07	99.05 \pm 0.11	101.79 \pm 0.01	104.21 \pm 0.01	104.03 \pm 0.004	103.79 \pm 0.01	104.12 \pm 0.003	103.05 \pm 0.01
RW11	100.55 \pm 0.18	104.77 \pm 0.03	104.04 \pm 0.09	104.69 \pm 0.02	104.28 \pm 0.002	102.11 \pm 0.002	101.38 \pm 0.01	102.38 \pm 0.03
RW13	101.29 \pm 0.06	102.19 \pm 0.03	101.16 \pm 0.05	104.08 \pm 0.02	104.48 \pm 0.008	104.11 \pm 0.004	102.35 \pm 0.07	104.19 \pm 0.002

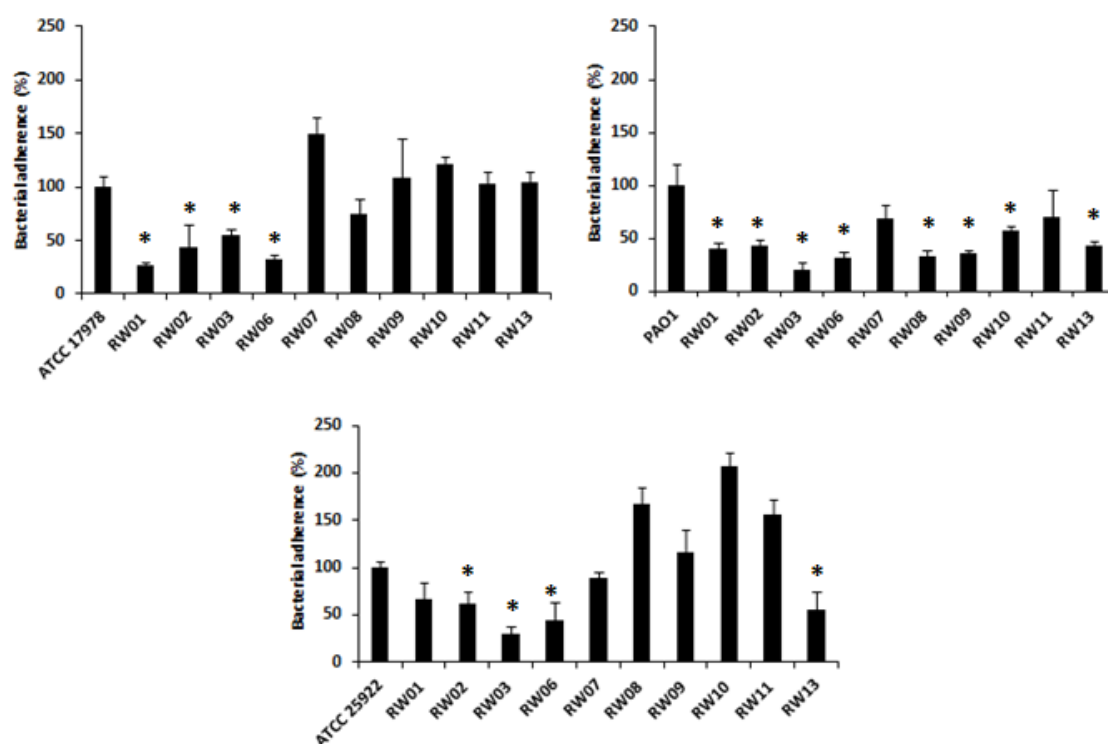


Figure 2. Bacterial adhesion assay of *A. baumannii* ATCC 17978, *P. aeruginosa* PAO1 and *E. coli* ATCC 25922 in presence of AOA-2 derivatives. Concentration of the peptides: 250 μ g/mL. *compared to the control, Student's t-test with $P < 0.05$.

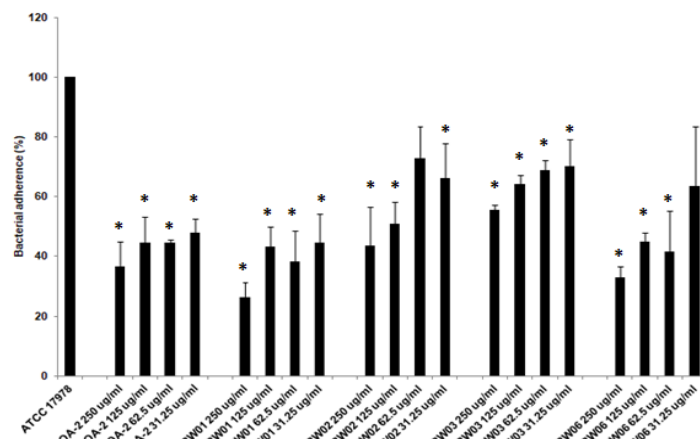
CAPÍTULO I. Artículo 2

Table 3. Summary of the effect of AOA-2 derivatives on the reduction of bacterial adhesion to A549 cells. YES: reduction of bacterial adhesion, NO: no reduction of bacterial adhesion.

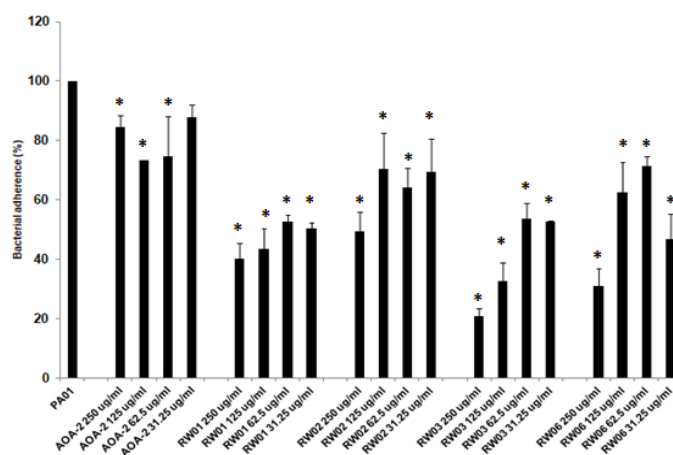
	<i>A. baumannii</i> ATCC 17978	<i>P. aeruginosa</i> PAO1	<i>E. coli</i> ATCC 25922
RW01	YES	YES	YES
RW02	YES	YES	YES
RW03	YES	YES	YES
RW06	YES	YES	YES
RW07	NO	YES	YES
RW08	YES	YES	NO
RW09	NO	YES	NO
RW10	NO	YES	NO
RW11	NO	YES	NO
RW13	NO	YES	YES

CAPÍTULO I. Artículo 2

A



B



C

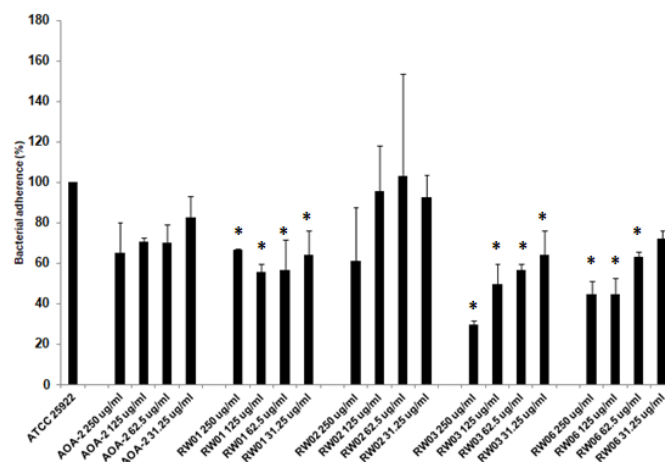


Figure 3. Bacterial adhesion assay of *A. baumannii* ATCC 17978 (A), *P. aeruginosa* PAO1 (B) and *E. coli* ATCC 25922 (C) in presence of AOA-2 and its derivatives RW01, RW02, RW03 and RW06. *compared to the control, Student's t-test with $P < 0.05$.

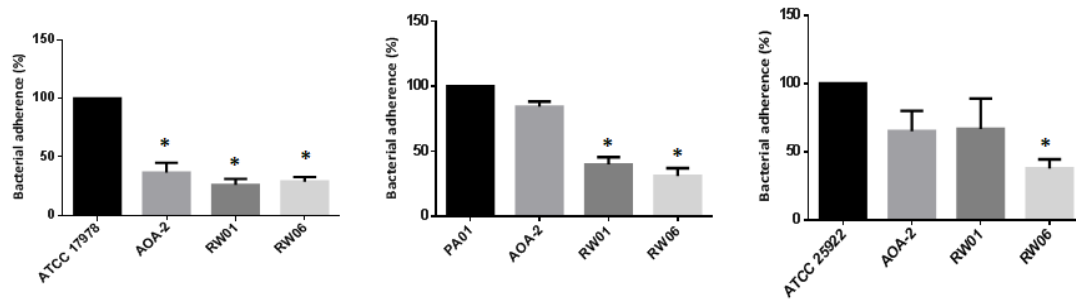


Figure 4. Bacterial adhesion assay of *A. baumannii* ATCC 17978, *P. aeruginosa* PAO1 and *E. coli* ATCC 25922 at 250 µg/mL of AOA-2, RW01 and RW06. *compared to the control, Student's t-test with $P < 0.05$.

CAPÍTULO I. Artículo 2

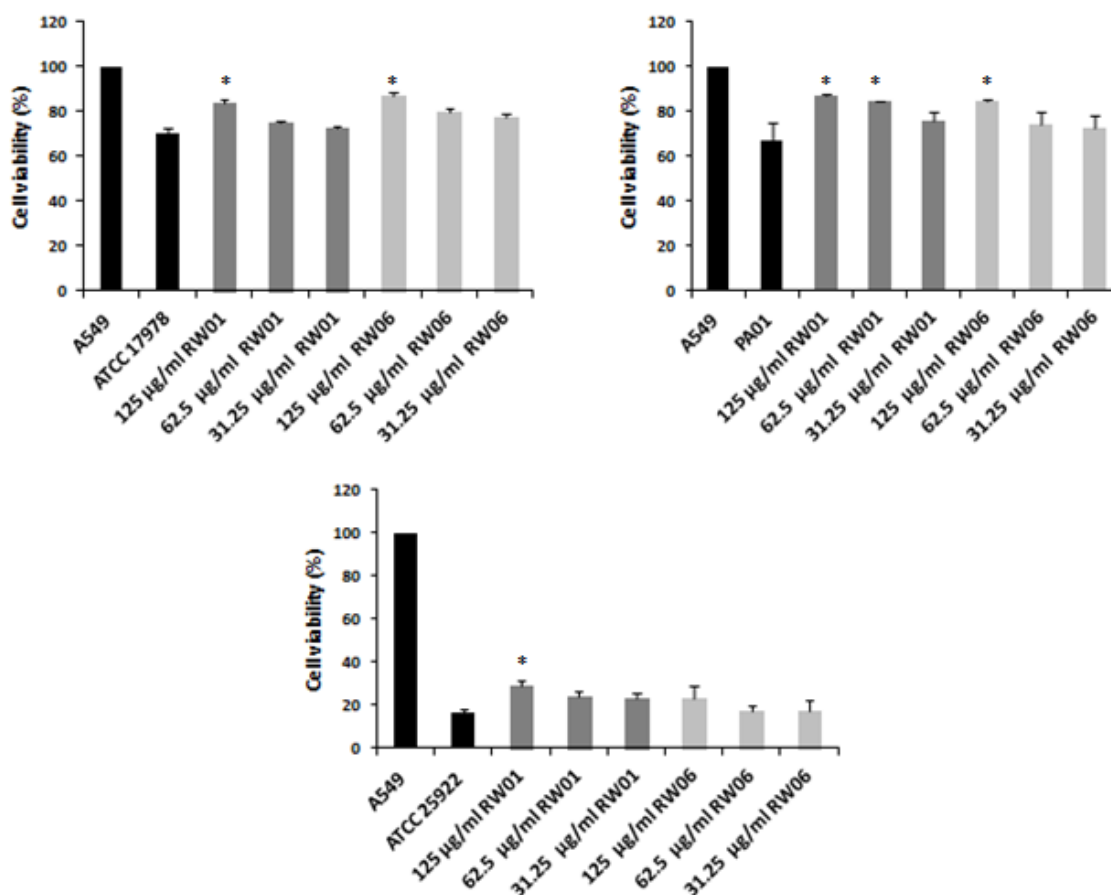


Figure 5. Cell viability assay of *A. baumannii* ATCC 17978, *P. aeruginosa* PAO1 and *E. coli* ATCC 25922 at different concentrations of AOA-2 derivatives RW01 and RW06.*compared to the infection group without treatment, Student's t-test with $P < 0.05$.

2. CAPÍTULO II

CAPÍTULO II. Artículo 3

2.1. Artículo 3. *Synergistic activity of niclosamide in combination with colistin against colistin-susceptible and colistin-resistant Acinetobacter baumannii and Klebsiella pneumoniae.*

En la época de la multirresistencia antibiótica, la colistina se considera como uno de los pocos antibióticos eficaces contra aislados clínicos multirresistentes de BGN como *A. baumannii* y *K. pneumoniae*. Sin embargo, en los últimos años, el fenómeno de resistencia a colistina entre estos patógenos es una realidad alarmante. En este escenario, las terapias de combinación como una alternativa terapéutica, entre la colistina y otros fármacos antiguos, puede conllevar a la restauración de la actividad de este antibiótico. Por esta razón, el objetivo principal de este estudio fue analizar la actividad de la niclosamida, un fármaco antihelmíntico utilizado para el tratamiento de la helmintiasis en humanos, en combinación con colistina contra cepas susceptibles a colistina (Col-S) y cepas resistentes a colistina (Col-R) de *A. baumannii* y *K. pneumoniae*.

Mediante el ensayo de microdilución se determinaron las CMI_s y se llevaron a cabo curvas de tiempo-muerte. También, se evaluó el potencial zeta de estas cepas Col-S y Col-R de *A. baumannii* y *K. pneumoniae* en presencia de la niclosamida. Así pues, la niclosamida en combinación con colistina mostró una mejor actividad contra estas cepas bacterianas. Las curvas de tiempo-muerte mostraron una actividad sinérgica entre la niclosamida y la colistina contra las cepas Col-S y Col-R de *A. baumannii* y *K. pneumoniae*, especialmente cuando se añadió una segunda administración de niclosamida o colistina a las 4 h de la curva tiempo-muerte. Las cepas Col-R de *A. baumannii* y *K. pneumoniae*, en presencia de niclosamida, exhibieron una mayor carga negativa ($-34,95 \pm 0.35\text{mV}$ y $-38,85 \pm 0.92\text{mV}$) que en ausencia de niclosamida ($-26,85 \pm 3.65\text{mV}$ y $-35,27 \pm 0.72\text{mV}$).

Estos datos sugieren que la combinación de niclosamida con colistina puede ser una potencial alternativa para el tratamiento de las infecciones por BGN resistentes a colistina. En este sentido, los siguientes pasos de este estudio serían evaluar la eficacia terapéutica de esta combinación en modelos animales experimentales de infección.



Synergistic Activity of Niclosamide in Combination With Colistin Against Colistin-Susceptible and Colistin-Resistant *Acinetobacter baumannii* and *Klebsiella pneumoniae*

OPEN ACCESS

Edited by:
Rodolfo García-Contreras,
Universidad Nacional Autónoma de
México, Mexico

Reviewed by:
Rafael Franco,
Instituto Nacional de Rehabilitación,
Mexico
Yael González Tinoco,
Centro de Investigación Científica y de
Educación Superior de Ensenada
(CICESE), Mexico
Riti Sharan,
Texas A&M Health Science Center,
United States

***Correspondence:**
Jerónimo Pachón
pachon@us.es
Younes Smani
ysmani-ibis@us.es

Received: 09 August 2018
Accepted: 11 September 2018
Published: 03 October 2018

Citation:
Ayerbe-Algaba R, Gil-Marqués ML,
Jiménez-Mejías ME,
Sánchez-Encinales V, Parra-Millán R,
Pachón-Ibáñez ME, Pachón J and
Smani Y (2018) Synergistic Activity of
Niclosamide in Combination With
Colistin Against Colistin-Susceptible
and Colistin-Resistant *Acinetobacter*
baumannii and *Klebsiella pneumoniae*.
Front. Cell. Infect. Microbiol. 8:348.
doi: 10.3389/fcimb.2018.00348

Rafael Ayerbe-Algaba¹, María Luisa Gil-Marqués¹, Manuel Enrique Jiménez-Mejías¹,
Viviana Sánchez-Encinales¹, Raquel Parra-Millán¹, María Eugenia Pachón-Ibáñez¹,
Jerónimo Pachón^{1,2*} and Younes Smani^{1*}

¹ Clinic Unit of Infectious Diseases, Microbiology and Preventive Medicine, Institute of Biomedicine of Seville (IBIS), University Hospital Virgen del Rocío/CSIC/University of Seville, Seville, Spain, ² Department of Medicine, University of Seville, Seville, Spain

Colistin is among the few antibiotics effective against multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* and *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates. However, in the last few years, colistin-resistant *A. baumannii* and *K. pneumoniae* strains have emerged. Therefore, combination therapies, between colistin and other old drugs, restoring the activity of colistin are required. The main objective of this study was to analyse the activity of niclosamide, an anthelmintic drug, in combination with colistin against colistin-susceptible (Col-S) and colistin-resistant (Col-R) *A. baumannii* and *K. pneumoniae*. The MIC were determined by microdilution assay and the time-kill curves were performed. The zeta potential of Col-S and Col-R of *A. baumannii* and *K. pneumoniae* in presence of niclosamide was assessed. Niclosamide in combination with colistin showed improved activity against Col-S and Col-R *A. baumannii* and *K. pneumoniae*. Time-killing curves showed synergic activity between niclosamide and colistin against Col-S and Col-R *A. baumannii* and *K. pneumoniae*, especially when niclosamide or colistin was added for second time at 4 h of the 24 h killing curve. Col-R *A. baumannii* and *K. pneumoniae* in presence of niclosamide exhibited a greater negative charge (-34.95 ± 0.35 mV and -38.85 ± 0.92 mV; $P < 0.05$) than Col-R *A. baumannii* and *K. pneumoniae* in absence of niclosamide (-26.85 ± 3.65 mV and -35.27 ± 0.72 mV). These data suggest that niclosamide might be combined with colistin, being a potential alternative for treatment of Col-R Gram-negative bacilli infections.

Keywords: repurposing drug, niclosamide, colistin, synergistic effect, *Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella pneumoniae*

INTRODUCTION

A number of infections caused by multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* and *Klebsiella pneumoniae* required the use of colistin, but both pathogens may rapidly acquire specific resistance mechanisms against colistin (Bonnin et al., 2013; Ah et al., 2014). Nowadays, the rates of colistin resistance worldwide vary between 3 and 28% for *A. baumannii*, and 2.8 and 10.5% for *K. pneumoniae* (Fernández-Cuenca et al., 2013; Ah et al., 2014). In this context, combination therapies between colistin and other drugs are among the new promising strategies to treat bacterial infections (Vila and Pachón, 2012; Cassir et al., 2014).

Classical combinations between colistin and other antimicrobial agents to which the isolate is resistant have been reported (Vila and Pachón, 2012; Paul et al., 2014). Their use has remained wide *in vitro* and in animal experimental model of infections (Vila and Pachón, 2012; Zusman et al., 2013). Few randomized controlled trials examining specific combinations have been completed or are ongoing, and are not sufficient to guide clinical practice (Paul et al., 2014; Poulikakos et al., 2014). This joins with the relatively short window of therapeutic application for severely ill patients for some combinations, and for the rapid emergence of drug resistance (Poulikakos et al., 2014).

In this context, “repurposing drugs,” defined as investigating new uses for already existing drugs, have gained renewed interest, as reflected by several recent studies (Chopra et al., 2010; Younis et al., 2015; Tharmalingam et al., 2018), and using them associated with colistin (Antunes et al., 2012; Zemke et al., 2014).

Niclosamide is an anthelmintic drug widely used for treating tape worm infection in humans and has lately been shown to possess anti-cancer and anti-diabetic activities (Tao et al., 2014; Ye et al., 2014). Niclosamide has also been identified as a potent anti-bacterial drug against *Helicobacter pylori* (Tharmalingam et al., 2018) and *Pseudomonas aeruginosa* by the inhibition of quorum sensing and various virulence genes, and by the reduction of elastase and pyocyanin levels (Imperi et al., 2013; Costabile et al., 2015). Moreover, Rajamuthiah et al., have reported that niclosamide present bacteriostatic activity against *Staphylococcus aureus* probably due the damage in their bacterial membrane but not against *A. baumannii*, *P. aeruginosa*, *E. coli*, and *K. pneumoniae* (Rajamuthiah et al., 2015; Gwisai et al., 2017). Currently there is no study regarding the combination between colistin and niclosamide to restore the activity of colistin against Gram-negative bacilli.

The aim of this study was to determine the *in vitro* activity of niclosamide in combination with colistin against colistin-susceptible and colistin-resistant *A. baumannii* and *K. pneumoniae* strains.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial Strains

Reference colistin-susceptible (Col-S) *A. baumannii* ATCC 17978 strain (Baumann et al., 1968), and 13 clinical colistin-resistant (Col-R) *A. baumannii* strains isolated from a hospital outbreak

in 2000 in Spain (Valencia et al., 2009) were used in this study. We also used reference Col-S *K. pneumoniae* CECT 997 strain (Reading and Cole, 1977), one Col-S and 2 Col-R clinical *K. pneumoniae* strains (Pachón-Ibáñez et al., 2018).

Pmra, PmrB, MgrB, Phop, and PhoQ Genes Amplification and Sequencing

In order to investigate the possible contribution of *pmrAB*, *mgrB*, and *phoPQ* to the colistin resistance in *A. baumannii* and *K. pneumoniae*, these genes were analyzed to detect any genetic alteration. DNA samples were obtained from the isolates by heating the colonies in water at 96°C. The genes were amplified using the primers listed in Table 1. The obtained bands were purified with the kit MEGAquick-spin plus (iNtRON Biotechnology, USA) and sequenced at the Institute of Biomedicine of Seville. The nucleotide and deduced protein sequences were analyzed using the Serial Cloner program (http://serialbasics.free.fr/Serial_Cloner.html).

In vitro Susceptibility Testing

MIC of colistin (Sigma, Spain), MIC of niclosamide (Sigma, Spain), and MIC of colistin in presence of different concentrations of niclosamide (between 0.5 and 4 µM) against Col-S and Col-R references and clinical *A. baumannii* and *K. pneumoniae* strains were determined in two independent experiments by broth microdilution assay according to CLSI recommendations for *A. baumannii* and EUCAST recommendations for *K. pneumoniae* (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2016 European Committee on Antimicrobial Susceptibility European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing [EUCAST], 2016). The initial inoculum of 5×10^5 CFU/mL for each strain was used in microtiter plates V (Deltalab, Spain) in presence of colistin, niclosamide, or colistin plus niclosamide, and incubated for 16–18 h at 37°C. *Escherichia coli* ATCC 25922 was used as control strain.

Time-Kill Kinetic Assays

Time-kill curves of *A. baumannii* ATCC 17978 and Col-R #11 strains and *K. pneumoniae* CECT 997 and KpC21 strains with starting inoculum of 1×10^6 CFU/mL, conducted on Mueller Hinton broth cation-adjusted, in presence of 2 µM niclosamide and colistin (sub-MIC) alone or in combination were performed in two independent experiments as previously described (Smani et al., 2011).

Moreover, in some conditions niclosamide was added for a second time 4 h after bacterial inoculation in order to avoid the antagonism effect of niclosamide with colistin observed in the first 4 h. In the same way colistin was added for a second time 4 h after bacterial inoculation because the half-life of colistin in bacterial culture broth is 4 h (Owen et al., 2007; Bergen et al., 2010). Bacterial cultures without drugs were carried out in parallel as controls. Tubes of each condition were incubated at 37°C with shaking and samples were taken at 0, 2, 4, 8, and 24 h and serially diluted. Viable counts were determined by plating 100 µL of control, test cultures, or dilutions at the indicated times onto sheep blood agar plates (Beckton Dickinson, USA). Plates were incubated for

CAPÍTULO II. Artículo 3

TABLE 1 | Primers list used in this study.

Pathogen	Gene	Primer name	Sequence	Amplicon size (bp)	References
<i>A. baumannii</i>	<i>pmrAB</i>	pmrAB-F	ATGACAAAATCTTGATGAT	1,335	López-Rojas et al., 2011
		pmrAB-R	TCACGCTCTTGTTCATGTA		
<i>K. pneumoniae</i>	<i>pmrAB</i>	pmrA-F	GCGAGATAATCTGTTCTCCA	808	Haeili et al., 2017
		pmrA-R	GGTCCAGGTTTCAGTTGCAA		Haeili et al., 2017
		pmrB-F1	GCGAAAAGATTGGCAAATCG	659	Haeili et al., 2017
		pmrB-R1	GGAAATGCTGGTGGTCATCTGA		Haeili et al., 2017
		pmrB-F2	CCCTGAATCAGTTGGTTTC	714	Haeili et al., 2017
		pmrB-R2	ATCAATGGGTGCTGACGTT		Haeili et al., 2017
	<i>mgrB</i>	mgrB-extF	AAGGCGTTTCATTCTACCACC	253	Poirrel et al., 2015
		mgrB-extR	TTAAGAAGGCCGTGCTATCC		Poirrel et al., 2015
	<i>phoPQ</i>	phoP-F	GAGCGTCAGACTACTATCGA	912	Haeili et al., 2017
		phoP-R	GTTTTCCATCTCGCCAGCA		Haeili et al., 2017
		phoQ-F1	CCACAGGACGTCATCACCA	636	Haeili et al., 2017
		phoQ-R1	AGCTCCACACCATATAGCTG		This study
		phoQ-F2	GAACAGGGCGACGACTCTG	617	This study
		phoQ-R2	TGAGAGCGGAAGTCAGGCT		This study
		phoQ-F3	GATGCTGGAGCAGATAAGCC	621	This study
		phoQ-R3	GCAGGTGTCTGACAGGATT		This study

24 h, and after colony counts, the log of viable cells (CFU/mL) was determined. Synergy was defined as a reduction ≥ 2 log CFU/mL with the combination respect to the more active drug (Pachón-Ibáñez et al., 2018). Thus, niclosamide was considered synergistic when in combination with colistin reduced the bacterial concentration ≥ 2 log CFU/mL with respect to colistin alone.

Zeta Potential Measurements

Zeta potential measurements were performed as previously described with minor modifications (Soon et al., 2011). Briefly, the bacterial surface was cleansed by washing twice with Milli-Q water, resuspended in Milli-Q water at 10^8 CFU/mL, and diluted 10-fold in the same medium immediately prior to zeta potential measurement. The resulting suspensions were used to fill clear disposable folded capillary zeta cells (Malvern, UK).

To examine the effect of niclosamide treatment on Col-S and Col-R *A. baumannii* and *K. pneumoniae* strains, $2\mu\text{M}$ niclosamide was added to 5 mL of bacterial culture at 10^8 CFU/mL, then incubated in a shaking bath (37°C , 180 rpm) for 20 min and prepared for zeta potential analysis as described above. The zeta potential measurement (mV) of bacterial cells was measured at 25°C with a zeta potential analyzer at 150 V (Zetasizer Nano ZS; Malvern Instruments, Malvern, UK).

Statistical Analysis

Group data are presented as mean \pm SEM. Student *t*-test was used to determine differences between means. Differences were considered significant at $P < 0.05$. The SPSS (version 17.0) statistical package was used (SPSS Inc.).

RESULTS

Colistin MIC and Resistance Mechanisms

The MIC for the Col-R *A. baumannii* and *K. pneumoniae* strains ranged from 32 to $> 256\mu\text{g/mL}$, while those for the susceptible reference strains were $0.5\mu\text{g/mL}$. The analysis of the *pmrA*, *pmrB*, *mgrB*, *phoP*, and *phoQ* sequences showed that Col-R *A. baumannii* strains presented only different amino acids substitution in *pmrB* (López-Rojas et al., 2016). Col-R *K. pneumoniae* strains presented IS1 transposase insertion in *mgrB* or different amino acids substitution in *pmrA* and *pmrB*, without substituting amino acid in *phoP* and *phoQ* (Table 2).

In vitro Activity of Niclosamide in Combination With Colistin Against Col-S and Col-R *A. baumannii* and *K. pneumoniae*

Niclosamide alone or in combination with colistin was tested against reference and clinical Col-S and Col-R *A. baumannii* and *K. pneumoniae* strains. The MIC is shown in Table 3. Niclosamide alone showed a range of MIC from 6.25 to $400\mu\text{M}$ for Col-S and Col-R *A. baumannii* strains, and from 400 to $>800\mu\text{M}$ for Col-S and Col-R *K. pneumoniae* strains.

Niclosamide at 1, 2, and $4\mu\text{M}$ in combination with colistin increased significantly the activity of colistin against all Col-S and Col-R strains. In contrast niclosamide, at $0.5\mu\text{M}$ in combination with colistin didn't increased the activity of colistin against most of Col-R *A. baumannii*. For the rest of experiments, we chose $2\mu\text{M}$ as niclosamide optimal concentration.

Time-Killing Curves

We examined the ability of niclosamide in combination with colistin to kill Col-S and Col-R *A. baumannii* strains (ATCC

TABLE 2 | Colistin MICs and description of Col-S and Col-R *A. baumannii* and *K. pneumoniae* strains used in this study.

Pathogen	Strain	Reference/Source	Description	Colistin MIC (μg/ml)
<i>A. baumannii</i>	ATCC 17978	Baumann et al., 1968	Colistin-susceptible reference strain	0.5
	#1	Valencia et al., 2009; López-Rojas et al., 2016	PDR clinical isolate with A236E amino acid substitution of <i>pmrB</i>	256
	#10	Valencia et al., 2009; López-Rojas et al., 2016	PDR clinical isolate with F387Y and S403F amino acids substitution of <i>pmrB</i>	>256
	#11	Valencia et al., 2009; López-Rojas et al., 2016	PDR clinical isolate with R263C amino acid substitution of <i>pmrB</i>	256
	#14	Valencia et al., 2009; López-Rojas et al., 2016	PDR clinical isolate with R263C amino acid substitution of <i>pmrB</i>	256
	#16	Valencia et al., 2009; López-Rojas et al., 2016	PDR clinical isolate with S403F amino acid substitution of <i>pmrB</i>	>256
	#17	Valencia et al., 2009; López-Rojas et al., 2016	PDR clinical isolate with R263C amino acid substitution of <i>pmrB</i>	64
	#19	Valencia et al., 2009; López-Rojas et al., 2016	PDR clinical isolate with T13A and S17G amino acids substitution of <i>pmrB</i>	>256
	#20	Valencia et al., 2009; López-Rojas et al., 2016	PDR clinical isolate with A227V and M308T amino acids substitution of <i>pmrB</i>	>256
	#21	Valencia et al., 2009; López-Rojas et al., 2016	PDR clinical isolate with P170Q amino acid substitution of <i>pmrB</i>	256
	#22	Valencia et al., 2009; López-Rojas et al., 2016	PDR clinical isolate with P170Q amino acid substitution of <i>pmrB</i>	>256
	#24	Valencia et al., 2009; López-Rojas et al., 2016	PDR clinical isolate with R263C amino acid substitution of <i>pmrB</i>	64
	#99	Valencia et al., 2009; López-Rojas et al., 2016	PDR clinical isolate with A227V amino acid substitution of <i>pmrB</i>	>256
	#113	Valencia et al., 2009; López-Rojas et al., 2016	PDR clinical isolate with L5S, R207C and G426S amino acids substitution of <i>pmrB</i>	>256
<i>K. pneumoniae</i>	CECT 997	Reading and Cole, 1977	Colistin-susceptible reference strain	0.5
	KPc07	Pachón-Ibáñez et al., 2018	Colistin-susceptible clinical isolate	0.5
	KPc21	Pachón-Ibáñez et al., 2018	Clinical isolate containing IS1 transposase insertion at nucleotide 22 of <i>mgrB</i>	64
	KPc29	Pachón-Ibáñez et al., 2018	Clinical isolate with a G56E and M215I amino acids substitution of <i>pmrA</i> , and R63P, S68N and R255G amino acids substitution of <i>pmrB</i>	32

17978 and #11) and Col-S and Col-R *K. pneumoniae* strains (CECT 997 and KPc21) in time course assays. Two micromolar niclosamide in combination with 0.25 μg/mL colistin, a colistin sub-MIC of ATCC 17978 strain, showed in the first 4 h no synergistic activity with respect to colistin alone, followed by later synergistic activity decreasing the bacterial cell count by 3.14 log CFU/mL with respect to colistin alone at 24 h (Figure 1A). Combination of 2 μM niclosamide with 8 μg/mL colistin, a colistin sub-MIC of #11 strain, showed higher synergistic activity, decreasing the bacterial cell count with respect to colistin alone by 5.93 log CFU/mL at 24 h (Figure 1A).

In the case of *K. pneumoniae*, 2 μM niclosamide in combination with 0.25 μg/mL colistin, a colistin sub-MIC of CECT 997 strain, didn't showed synergistic effect with colistin during 24 h (Figure 1B). In contrast, 2 μM niclosamide in combination with 32 μg/mL colistin, a colistin sub-MIC of KPc21 strain, showed synergistic activity with respect to colistin alone decreasing the bacterial cell count by 3.38 log CFU/mL at 24 h

(Figure 1B). In a control experiment, 2 μM niclosamide had no effect on the growth of Col-S and Col-R *A. baumannii* and *K. pneumoniae* strains (Figure 1A,B).

With these results, since the half-life of colistin in bacterial culture broth is 4 h (Owen et al., 2007; Bergen et al., 2010) and can be degraded during time-kill curve experiments (Mohamed et al., 2014), we cannot rule out the possibility that the absence of synergistic activity of niclosamide in combination with colistin observed especially with *K. pneumoniae* CECT 997 strain (Figure 1B) would be due to colistin degradation in the bacterial culture broth.

Consequently, to maintain the colistin concentration in the medium, in the following experiments we added 0.25 μg/mL colistin after 4 h post-incubation with the initial 2 μM niclosamide and 0.25 μg/mL colistin, or with 0.25 μg/mL colistin alone. This approach produced synergy between niclosamide and colistin, decreasing the bacterial cell count of CECT 997 strain by 4.62 log CFU/mL with respect to colistin plus

CAPÍTULO II. Artículo 3

Ayerbe-Algaba et al.

Niclosamide Synergy With Colistin

TABLE 3 | Determination of MIC of niclosamide and colistin alone or in combination against Col-S and Col-R *A. baumannii* and *K. pneumoniae*.

Pathogen	Strain	Nicl MIC (μM)	Col MIC (μg/ml)	Col MIC (μg/ml)			
				+ Nicl 4 μM	+ Nicl 2 μM	+ Nicl 1 μM	+ Nicl 0.5 μM
<i>A. baumannii</i>	ATCC 17978	25	0.5	<0.03	<0.03	<0.03	0.25
	#1	25	256	0.06	0.5	256	>256
	#10	400	>256	0.03	0.5	32	ND
	#11	200	256	0.06	0.25	32	>256
	#14	6.25	256	0.06	0.25	32	256
	#16	50	>256	0.03	0.5	64	ND
	#17	12.5	64	< 0.03	0.125	8	64
	#19	12.5	>256	0.125	2	128	>256
	#20	12.5	>256	0.125	1	64	>256
	#21	200	256	< 0.03	< 0.03	8	16
	#22	200	>256	< 0.03	< 0.03	0.5	16
	#24	64	64	0.06	0.125	8	64
	#99	400	>256	0.03	0.5	16	>256
	#113	400	>256	0.06	1	8	256
<i>K. pneumoniae</i>	CECT 997	>800	0.5	0.06	0.06	0.125	0.125
	KPc07	400	0.5	0.06	0.06	0.125	0.125
	KPc21	>800	64	< 0.015	< 0.015	0.15	32
	KPc29	800	32	0.25	0.5	1	4

Values in bold indicate the condition in which the presence of niclosamide changed the bacterial colistin susceptibility from resistant to susceptible. One micromolar of niclosamide correspond to 0.33 μg/ml. Nicl, niclosamide; Col, colistin; ND, not determined.

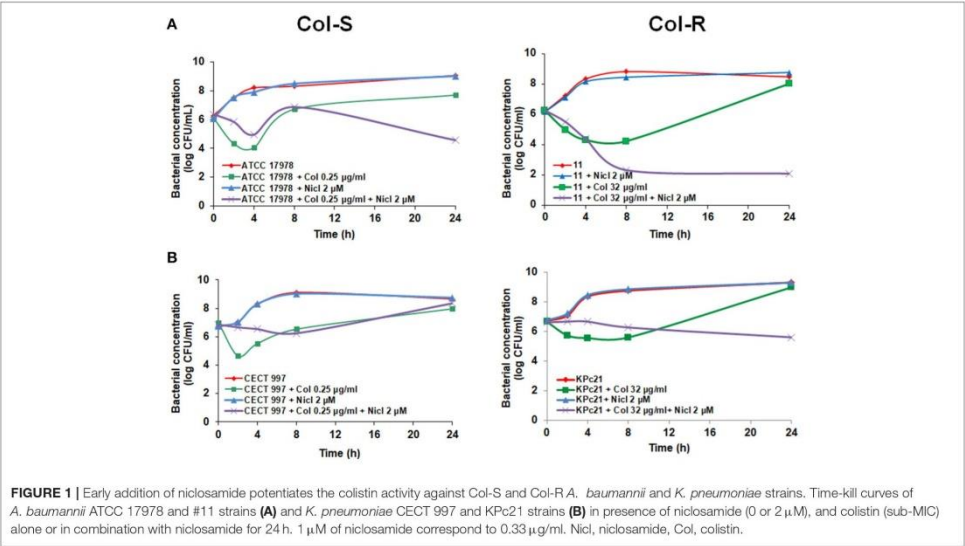


FIGURE 1 | Early addition of niclosamide potentiates the colistin activity against Col-S and Col-R *A. baumannii* and *K. pneumoniae* strains. Time-kill curves of *A. baumannii* ATCC 17978 and #11 strains (A) and *K. pneumoniae* CECT 997 and KPc21 strains (B) in presence of niclosamide (0 or 2 μM), and colistin (sub-MIC) alone or in combination with niclosamide for 24 h. 1 μM of niclosamide correspond to 0.33 μg/ml. Nicl, niclosamide; Col, colistin.

colistin at 24 h (Figure 2B). Similarly, the addition of 32 μg/mL colistin after 4 h post-incubation with niclosamide and 32 μg/mL colistin decreased the growth of KPc21 strain by 4.38 log CFU/mL with respect to colistin plus colistin at 24 h (Figure 2B).

In the case of *A. baumannii* ATCC 17978 strain, the addition of colistin for second time at 4 h increased the synergy between niclosamide and colistin plus colistin decreasing the bacterial cell count by 2.37 log CFU/mL with respect to niclosamide plus

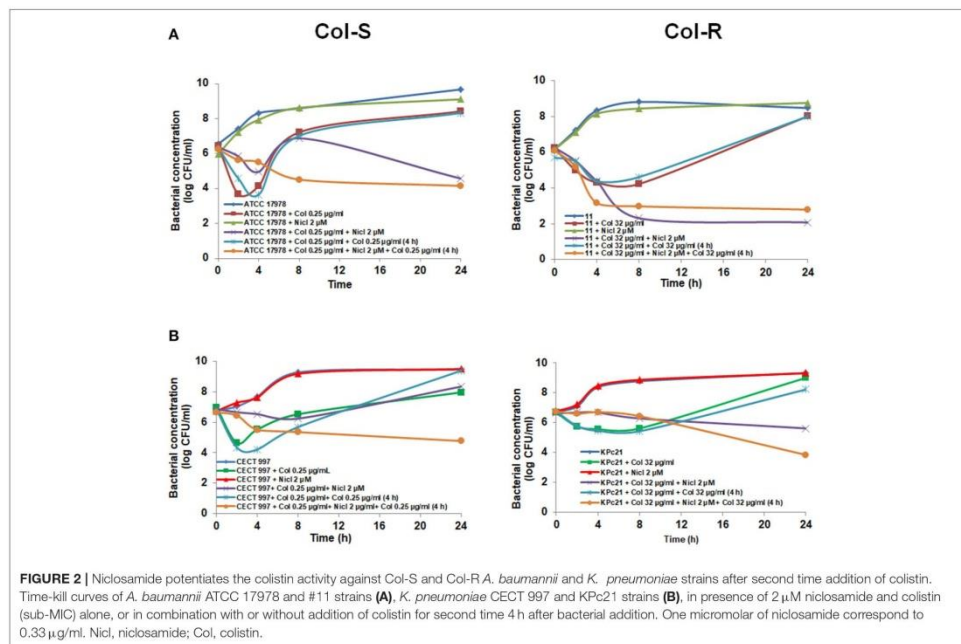


FIGURE 2 | Niclosamide potentiates the colistin activity against Col-S and Col-R *A. baumannii* and *K. pneumoniae* strains after second time addition of colistin. Time-kill curves of *A. baumannii* ATCC 17978 and #11 strains (A), *K. pneumoniae* CECT 997 and KPC21 strains (B), in presence of 2 µM niclosamide and colistin (sub-MIC) alone, or in combination with or without addition of colistin for second time 4 h after bacterial addition. One micromolar of niclosamide correspond to 0.33 µg/ml. Nici, niclosamide; Col, colistin.

colistin, without the addition of colistin at 4 h, at 8 h (Figure 2A). In contrast, with #11 strain the addition of colistin for second time did not improve the synergy between niclosamide and colistin observed in the (Figures 1, 2A).

Furthermore, to avoid the antagonism effect of niclosamide with colistin observed in the first 4 h (Figures 1, 2), we added 2 µM niclosamide after 4 h post-incubation with 0.25 and 8 µg/mL colistin, sub-MIC of *A. baumannii* ATCC 17978 and #11 strains, respectively. We observed a decrease in the growth of ATCC 17978 and #11 strains by 5.06 and 3.38 log CFU/mL, respectively, with respect to colistin alone at 24 h (Figure 3A).

In the case of *K. pneumoniae*, we added 2 µM niclosamide after 4 h post-incubation with 0.25 and 32 µg/mL colistin, sub-MIC of CECT 997 and KPC21 strains, respectively. We observed a decrease in the growth of CECT 997 and KPC21 strain by 3.89 and 4.98 log CFU/mL, respectively, with respect to colistin alone at 24 h (Figure 3B). In the control experiment, addition of 2 µM niclosamide after 4 h post-bacterial incubation had no effect on the growth of Col-S and Col-R *A. baumannii* and *K. pneumoniae* strains (Figures 3A, 3B).

Zeta Potential

Figure 4 illustrates the zeta potential of *A. baumannii* ATCC 17978 and #11 strains in presence and absence of niclosamide. Analysis of zeta potential revealed that treatment of ATCC 17978

and #11 strains with 2 µM niclosamide exhibited significantly high negative surface charge by -35.62 ± 1.32 mV and -34.95 ± 0.35 mV, respectively with respect to ATCC 17978 and #11 strains without treatment with niclosamide, -32.33 ± 0.63 and -26.85 ± 3.65 mV, respectively. Similarly, analysis of zeta potential revealed that treatment of *K. pneumoniae* CECT 997 and KPC21 strains with 2 µM niclosamide exhibited significantly high negative surface charge by -40.23 ± 0.88 mV and -38.85 ± 0.93 mV, respectively with respect to CECT 997 and KPC21 strains without treatment with niclosamide, -36.7 ± 0.88 and -35.27 ± 0.72 mV, respectively (Figure 4).

DISCUSSION

Colistin resistance, although uncommon, is increasingly being reported among clinical Gram-negative bacilli isolates, and an understanding of its impact on the activity of antimicrobials is now evolving (Olaitan et al., 2014). Modification of LPS is one of the colistin resistance mechanisms in Gram negative bacilli that result in the increase of positive surface charge of the bacterial outer membrane (Olaitan et al., 2014).

Niclosamide's ability to carrier proton has been previously used to investigate the potential of niclosamide for blocking the acidification of endosomes in eukaryotic cells (Jurgeit et al., 2012). Thus, the use of niclosamide to carrier the

CAPÍTULO II. Artículo 3

Ayerbe-Algaba et al.

Nicosamide Synergy With Colistin

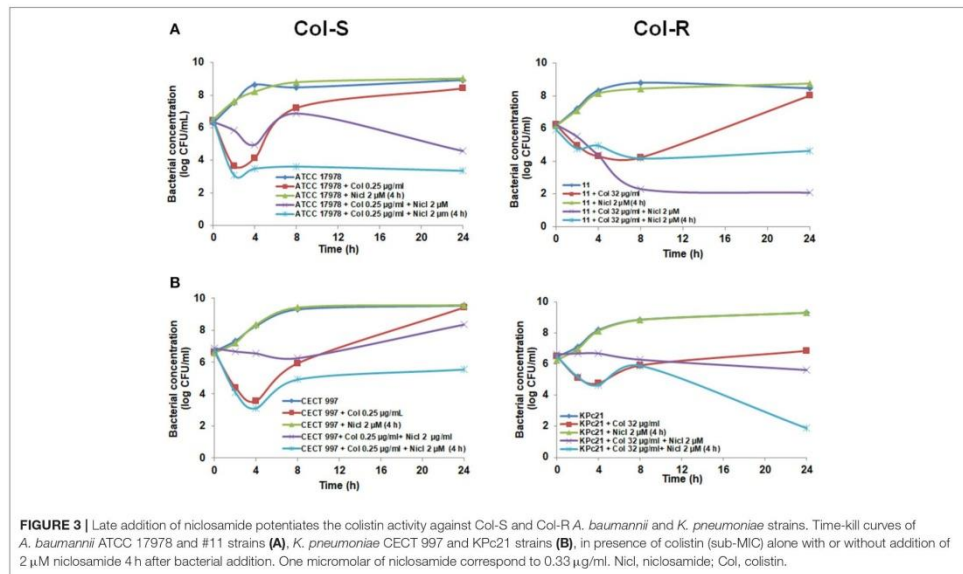


FIGURE 3 | Late addition of nicosamide potentiates the colistin activity against Col-S and Col-R *A. baumannii* and *K. pneumoniae* strains. Time-kill curves of *A. baumannii* ATCC 17978 and #11 strains (A), *K. pneumoniae* CECT 997 and KPc21 strains (B), in presence of colistin (sub-MIC) alone with or without addition of 2 µM nicosamide 4 h after bacterial addition. One micromolar of nicosamide correspond to 0.33 µg/ml. Nici, nicosamide; Col, colistin.

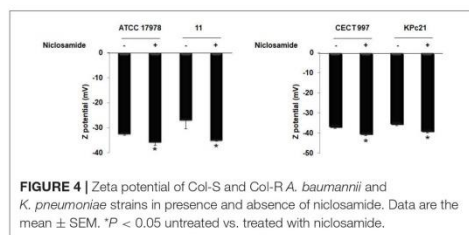


FIGURE 4 | Zeta potential of Col-S and Col-R *A. baumannii* and *K. pneumoniae* strains in presence and absence of nicosamide. Data are the mean \pm SEM. * $P < 0.05$ untreated vs. treated with nicosamide.

proton in the outer membrane of Col-R strains could be helpful to restore the activity of colistin against Gram negative bacilli.

In the present study, the combination of nicosamide with colistin potentiates the activity of colistin against Col-S and especially Col-R *A. baumannii* and *K. pneumoniae* strains at 24 h, despite of the antagonist effect of nicosamide on the antibacterial effect of colistin against these strains in the first 4 h. Similar results regarding the antagonism of the colistin effect were observed in the first 4–8 h when colistin was combined with doripenem or ertapenem against a clinical isolate of *K. pneumoniae* resistant to colistin, doripenem, and ertapenem (Hong et al., 2013), and with levofloxacin against a clinical isolate of *A. baumannii* resistant to levofloxacin (Safarika et al., 2015). In the present study, this antagonism has been corrected when nicosamide was added 4 h after bacterial and colistin incubation.

It is noteworthy to mention that the use of nicosamide alone did not affect the growth of Col-S and Col-R *A. baumannii* and *K. pneumoniae* strains, which is consistent with previously published data in which nicosamide was not effective against Gram-negative bacilli including *A. baumannii* and *K. pneumoniae* (Rajamuthiah et al., 2015). In addition, the synergy between nicosamide and colistin was increased when colistin was added for second time 4 h post-bacterial due to a possible compensation of colistin degradation in the broth culture (Owen et al., 2007; Bergen et al., 2010).

It is well known that nicosamide does not cause significant bacterial cell envelope damage in Gram-positive pathogens (Rajamuthiah et al., 2015), and Gram-negative bacilli may have intrinsic resistance to nicosamide due to their functional and structural characteristics (Blair et al., 2014). Interestingly, despite the fact that nicosamide does not appear to inhibit *A. baumannii* and *K. pneumoniae* growth, we demonstrated, for the first time, that nicosamide increased the negative surface charge of Col-S and Col-R *A. baumannii* and *K. pneumoniae* strains. This effect was higher with Col-R than with Col-S *A. baumannii* and *K. pneumoniae* strains. This fact would be due to the proportion of negative and positive surface charge in these strains. Indeed, we observed that Col-R strains contain less negative surface charges than Col-S strains. These data are consistent with previously published reports, showing less negative surface charges in Col-R *A. baumannii* and *K. pneumoniae* (Soon et al., 2011; Velkov et al., 2014). Recently, it was reported that salicylanilide analogs inhibit *Clostridioides difficile* growth via membrane depolarization by

dissipation of the bacterial membrane potential (Gooyit and Janda, 2016).

Furthermore, we showed that Col-R *A. baumannii* strain did not improve the synergy with niclosamide while adding the second colistin dose. A explanation for this data would be that the binding of colistin to the cell wall of this strain is saturated after the first addition of colistin in medium. Indeed, this strain, in presence of niclosamide, has presented lower zeta potential level (-34.95 ± 0.35 mV) than with *K. pneumoniae* CECT 997 strain (-40.23 ± 0.88 mV), *K. pneumoniae* KpC21 strain (-38.85 ± 0.93 mV), and *A. baumannii* ATCC 17978 strain (-35.62 ± 1.32 mV) which suggest the colistin binding saturation.

We have not shown that the incubation of *A. baumannii* and *K. pneumoniae* with niclosamide affect their OMPs profiles (data not shown). Thus, further investigations, including the integrity of bacterial membrane by transmission electron microscopy, are necessary to better understand how niclosamide acts synergistically with colistin against Col-S and Col-R *A. baumannii* and *K. pneumoniae* strains.

Concerning future developments of niclosamide as potent synergic drug with colistin, niclosamide derivative or same structural class of niclosamides, i.e., the salicylanilide oxyclozanide, need to be evaluated in combination with colistin. Previous studies showed that oxyclozanide present same activities as niclosamide against *P. aeruginosa* and *S. aureus* (Imperi et al., 2013; Rajamuthiah et al., 2015). Furthermore, It should be a very interesting exercise to assay *in vitro* the anti-quorum sensing of niclosamide (Imperi et al., 2013; Costabile et al., 2015) in combination with colistin and *in vivo* the colistin niclosamide combination in an infection model like the silk worm *Galleria mellonella*.

CONCLUSIONS

Niclosamide has potentiated the effect of colistin against Col-S and Col-R *A. baumannii* and *K. pneumoniae* strains. This effect might be due to the alteration of negative surface charge proportion in the outer membrane of these strains. The results of this study provide new insights into the use of niclosamide in combination with colistin to treat the infections by Gram negative bacilli.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

JP and YS conceived the study. RA-A, MG-M, VS-E, RP-M, and MP-I carried out the experiments. RA-A and YS analyzed the data. MJ-M, MP-I, and JP have reviewed the manuscript and the experiments. RA-A and YS wrote the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

FUNDING

This study was supported by the Instituto de Salud Carlos III, Proyectos de Investigación en Salud (grant PI16/01378). YS is supported by the Subprograma Miguel Servet Tipo I from the Ministerio de Economía y Competitividad of Spain (CP15/01358).

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Dr. Alvaro Pascual for the kind gift of the *K. pneumoniae* strains KpC07, KpC21 and KpC29. We thank Dr. Javier Sánchez-Céspedes for helping with anthelmintic drug screening.

REFERENCES

- European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing [EUCAST] (2016). *European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. Clinical Breakpoints*. Bochum: EUCAST.
- Ah, Y. M., Kim, A. J., and Lee, J. Y. (2014). Colistin resistance in *Klebsiella pneumoniae*. *Int. J. Antimicrob. Agents* 44, 8–15. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2014.02.016
- Antunes, L. C., Imperi, F., Minandri, F., and Visca, P. (2012). *in vitro* and *in vivo* antimicrobial activities of gallium nitrate against multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 56, 5961–5970. doi: 10.1128/AAC.01519-12
- Baumann, P., Doudoroff, M., and Stanier, R. Y. (1968). A study of the Moraxella group II. Oxidative-negative species (genus *Acinetobacter*). *J. Bacteriol.* 95, 1520–1541.
- Bergen, P. J., Bulitta, J. B., Forrest, A., Tsuji, B. T., Li, J., and Nation, R. L. (2010). Pharmacokinetic/pharmacodynamic investigation of colistin against *Pseudomonas aeruginosa* using an *in vitro* model. *Antimicrob. Agents Chemother.* 54, 3783–3789. doi: 10.1128/AAC.00903-09
- Blair, J. M., Webber, M. A., Baylay, A. J., Ogbolu, D. O., and Piddock, L. J. V. (2014). Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Nat. Rev. Microbiol.* 13, 42–51. doi: 10.1038/nrmicro3380
- Bonnin, A. R., Nordmann, P., and Poiriel, L. (2013). Screening and deciphering antibiotic resistance in *Acinetobacter baumannii*: a state of the art. *Expert Rev. Anti. Infect. Ther.* 11, 571–583. doi: 10.1586/eri.13.38
- Cassir, N., Rolain, J. M., and Brouqui, P. (2014). A new strategy to fight antimicrobial resistance: the revival of old antibiotics. *Front. Microbiol.* 5:551. doi: 10.3389/fmicb.2014.00551
- Chopra, S., Torres-Ortiz, M., Hokama, L., Madrid, P., Tanga, M., Mortelmans, K., et al. (2010). Repurposing FDA-approved drugs to combat drug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *J. Antimicrob. Chemother.* 65, 2598–2601. doi: 10.1093/jac/dkq353
- Clinical and Laboratory Standards Institute (2016). *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. Twenty-Sixth Informational Supplement. Document M100-S26. CLSI*. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.
- Costabile, G., d'Angelo, I., Rampioni, G., Bondi, R., Pompili, B., Ascenzioni, F., et al. (2015). Towards repositioning niclosamide for anti-virulence therapy of *Pseudomonas aeruginosa* lung infections: development of inhalable formulations through nanosuspension technology. *Mol. Pharm.* 12, 2604–2617. doi: 10.1021/acs.molpharmaceut.5b00098
- Fernández-Cuenca, F., Tomás-Carmona, M., Caballero-Moyano, F., Bou, G., Martínez-Martínez, L., Vila, J., et al. (2013). *in vitro* activity of 18 antimicrobial agents against clinical isolates of *Acinetobacter* spp.: multicenter national study GEIH-REIPI-Ab 2010. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 31, 4–9. doi: 10.1016/j.eimc.2012.06.010
- Gooyit, M., and Janda, K. M. (2016). Reprofiled anthelmintics bates hypervirulent stationary-phase *Clostridium difficile*. *Sci. Rep.* 6:33642. doi: 10.1038/srep33642
- Gwisai, T., Hollingsworth, N. R., Cowles, S., Tharmalingam, N., Mylonakis, E., Burgwyn Fuchs, B., et al. (2017). Repurposing niclosamide as a versatile

CAPÍTULO II. Artículo 3

- antimicrobial surface coating against device-associated. Hospital-acquired bacterial infections. *Biomed. Mater.* 12:045010. doi: 10.1088/1748-605X/aa7105
- Haeili, M., Javani, A., Moradi, J., Jafari, Z., Feizabadi, M. M., and Babaei, E. (2017). MgrB alterations mediate colistin resistance in *Klebsiella pneumoniae* isolates from Iran. *Front. Microbiol.* 8, 1–8. doi: 10.3389/fmicb.2017.02470
- Hong, J. H., Clancy, C. J., Cheng, S., Shields, R. K., Chen, L., Doi, Y., et al. (2013). Characterization of porin expression in *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase (KPC)-producing *K. pneumoniae* isolates identifies isolates most susceptible to the combination of colistin and carbapenems. *Antimicrob. Agents Chemother.* 57, 2147–2153. doi: 10.1128/AAC.02411-12
- Imperi, F., Massai, F., Ramachandran Pillai, C., Longo, F., Zennaro, E., Rampioni, G., et al. (2013). New life for an old drug: the anthelmintic drug niclosamide inhibits *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing. *Antimicrob. Agents Chemother.* 57, 996–1005. doi: 10.1128/AAC.01952-12
- Jurget, A., McDowell, R., Moese, S., Meldrum, E., Schwendener, R., and Greber, U. F. (2012). Niclosamide is a proton carrier and targets acidic endosomes with broad antiviral effects. *PLoS Pathog.* 8:e1002976. doi: 10.1371/journal.ppat.1002976
- López-Rojas, R., Domínguez-Herrera, J., McConnell, M. J., Docobo-Peréz, F., Smani, Y., Fernández-Reyes, M., et al. (2011). Impaired virulence and *in vivo* fitness of colistin-resistant *Acinetobacter baumannii*. *J. Infect. Dis.* 203, 545–548. doi: 10.1093/infdis/jiq086
- López-Rojas, R., García-Quintanilla, M., Labrador-Herrera, G., Pachón, J., and McConnell, M. J. (2016). Impaired growth under iron-limiting conditions associated with the acquisition of colistin resistance in *Acinetobacter baumannii*. *Int. J. Antimicrob. Agents* 47, 473–477. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2016.03.010
- Mohamed, A. F., Cars, O., and Friberg, L. E. (2014). A pharmacokinetic/pharmacodynamic model developed for the effect of colistin on *Pseudomonas aeruginosa in vitro* with evaluation of population pharmacokinetic variability on simulated bacterial killing. *J. Antimicrob. Chemother.* 69, 1350–1361. doi: 10.1093/jac/dkt520
- Olaitan, A. O., Morand, S., and Rolain, J. M. (2014). Mechanisms of polymyxin resistance: acquired and intrinsic resistance in bacteria. *Front. Microbiol.* 5:643. doi: 10.3389/fmicb.2014.00643
- Owen, R. J., Li, J., Nation, R. L., and Spelman, D. (2007). *in vitro* pharmacodynamics of colistin against *Acinetobacter baumannii* clinical isolates. *J. Antimicrob. Chemother.* 59, 473–477. doi: 10.1093/jac/dkl512
- Pachón-Ibáñez, M. E., Labrador-Herrera, G., Cebrero-Cangueiro, T., Díaz, C., Smani, Y., Del Palacio, J. P., et al. (2018). Efficacy of colistin and its combination with rifampin *in vitro* and in experimental models of infection caused by carbapenemase-producing clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*. *Front. Microbiol.* 9:912. doi: 10.3389/fmicb.2018.00912
- Paul, M., Carmeli, Y., Durante-Mangoni, E., Mouton, J. W., Tacconelli, E., Theuretzbacher, U., et al. (2014). Combination therapy for carbapenem-resistant Gram-negative bacteria. *J. Antimicrob. Chemother.* 69, 2305–2309. doi: 10.1093/jac/dku168
- Poirrel, L., Jayol, A., Bontron, S., Villegas, M. V., and Ozdamar, R., Tükkoglu, S., et al. (2015). The *mgrB* gene as a key target for acquired resistance to colistin in *Klebsiella pneumoniae*. *J. Antimicrob. Chemother.* 70, 75–80. doi: 10.1093/jac/dku323
- Poulikakos, P., Tansarli, G. S., and Falagas, M. E. (2014). Combination antibiotic treatment versus monotherapy for multidrug-resistant, extensively drug-resistant, and pandrug-resistant *Acinetobacter* infections: a systematic review. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 33, 1675–1685. doi: 10.1007/s10096-014-2124-9
- Rajamuthiah, R., Fuchs, B. B., Conery, A. L., Kim, W., Jayamani, E., Kwon, B., et al. (2015). Repurposing Salicylanilide anthelmintic drugs to combat drug resistant *Staphylococcus aureus*. *PLoS ONE* 10:e0124595. doi: 10.1371/journal.pone.0124595
- Reading, C., and Cole, M. (1977). Clavulanic acid: a beta-lactamase-inhibiting beta-lactam from *Streptomyces clavuligerus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 11, 852–857. doi: 10.1128/AAC.11.5.852
- Safarika, A., Galani, L., Pistiki, A., and Giamarellos-Bourboulis, E. J. (2015). Time-kill effect of levofloxacin on multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*: synergism with imipenem and colistin. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 34, 317–323. doi: 10.1007/s10096-014-2231-7
- Smani, Y., Domínguez-Herrera, J., and Pachón, J. (2011). Rifampin protects human lung epithelial cells against cytotoxicity induced by clinical multi and pandrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *J. Infect. Dis.* 203, 1110–1119. doi: 10.1093/infdis/jiq159
- Soon, R. L., Nation, R. L., Cockram, S., Moffatt, J. H., Harper, M., Adler, B., et al. (2011). Different surface charge of colistin-susceptible and -resistant *Acinetobacter baumannii* cells measured with zeta potential as a function of growth phase and colistin treatment. *J. Antimicrob. Chemother.* 66, 126–133. doi: 10.1093/jac/dkq422
- Tao, H., Zhang, Y., Zeng, X., Shulman, G. I., and Jin, S. (2014). Niclosamide ethanalamine-induced mild mitochondrial uncoupling improves diabetic symptoms in mice. *Nat. Med.* 20, 1263–1269. doi: 10.1038/nm.3699
- Tharmalingam, N., Port, J., Castillo, D., and Mylonakis, E. (2018). Repurposing the anthelmintic drug niclosamide to combat *Helicobacter pylori*. *Sci. Rep.* 8:3701. doi: 10.1038/s41598-018-22037-x
- Valencia, R., Arroyo, L. A., Conde, M., Aldana, J. M., Torres, M. J., Fernández-Cuenca, F., et al. (2009). Nosocomial outbreak of infection with pan-drug-resistant *Acinetobacter baumannii* in a tertiary care university hospital. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* 30, 257–263. doi: 10.1086/595977
- Velkov, T., Deris, Z. Z., Huang, J. X., Azad, M. A., Butler, M., Sivanesan, S., et al. (2014). Surface changes and polymyxin interactions with a resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*. *Innate Immun.* 20, 350–363. doi: 10.1177/1753425913493337
- Vila, J., and Pachón, J. (2012). Therapeutic options for *Acinetobacter baumannii* infections: an update. *Expert Opin. Pharmacother.* 13, 2319–2336. doi: 10.1517/14656566.2012.729820
- Ye, T., Xiong, Y., Yan, Y., Xia, Y., Song, X., Liu, L., et al. (2014). The anthelmintic drug niclosamide induces apoptosis, impairs metastasis and reduces immunosuppressive cells in breast cancer model. *PLoS ONE* 9:e85887. doi: 10.1371/journal.pone.0085887
- Younis, W., Thangamani, S., and Seleem, M. N. (2015). Repurposing Non-antimicrobial drugs and clinical molecules to treat bacterial infections. *Curr. Pharm. Des.* 21, 4106–41011. doi: 10.2174/1381612821666150506154434
- Zemke, A. C., Shiva, S., Burns, J. L., Moskowitz, S. M., Pilewski, J. M., Gladwin, M. T., et al. (2014). Nitrite modulates bacterial antibiotic susceptibility and biofilm formation in association with airway epithelial cells. *Free Radic. Biol. Med.* 77, 307–316. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2014.08.011
- Zusman, O., Avni, T., Leibovici, L., Adler, A., Friberg, L., Stergiopoulou, T., et al. (2013). Systematic review and meta-analysis of *in vitro* synergy of polymyxins and carbapenems. *Antimicrob. Agents Chemother.* 57, 5104–5111. doi: 10.1128/AAC.01230-13

Conflict of Interest Statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2018 Ayerbe-Algaba, Gil-Marqués, Jiménez-Mejías, Sánchez-Encinales, Parra-Millán, Pachón-Ibáñez, Pachón and Smani. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

CAPÍTULO II. Artículo 3

2.1. Artículo 4. *The anthelmintic oxyclozanide restores the colistin activity in colistin-resistant Gram-negative bacilli.*

El desarrollo de alternativas terapéuticas no antimicrobianas es una aproximación de actualidad debido a la situación de emergencia que supone la resistencia a los antibióticos por parte de los BGN. Estas opciones, junto a los pocos y no óptimos agentes antimicrobianos disponibles, tales como la colistina, se han convertido en una necesidad de urgencia clínica. En este contexto, la desregulación de la pared celular bacteriana podría ser un efecto adyuvante terapéutico alternativo que potencie la acción de la colistina. Bajo este escenario, el objetivo de este estudio fue analizar la actividad de la oxiclozanida, un fármaco antihelmíntico usado en veterinaria, en combinación con colistina contra BGN susceptibles a colistina (Col-S) y resistentes a colistina (Col-R).

Se estudiaron tres cepas Col-S de referencia y 13 aislados clínicos Col-R de *A. baumannii*, *P. aeruginosa* y *K. pneumoniae*. Se llevaron a cabo ensayos de microdilución y curvas de letalidad con el fin de examinar la actividad de la oxiclozanida en combinación con colistina. También se evaluó el perfil de proteínas de membrana externa (OMPs), la permeabilidad de la membrana así como la estructura de la pared celular de cepas Col-S y Col-R de *A. baumannii*, *P. aeruginosa* y *K. pneumoniae* en presencia de oxiclozanida mediante electroforesis SDS-PAGE, ensayos de fluorescencia y microscopía electrónica de transmisión, respectivamente. La combinación de oxiclozanida con colistina aumentó la actividad de colistina contra las cepas de Col-S y Col-R de los tres patógenos estudiados. Las curvas de tiempo-muerte mostraron una actividad sinérgica entre la oxiclozanida y la colistina contra estas cepas bacterianas. Además, las cepas Col-R de *A. baumannii*, *P. aeruginosa* y *K. pneumoniae*, en presencia de oxiclozanida, presentaron una permeabilidad superior así como una alteración estructural en su pared celular más evidente que en las cepas Col-S. Estos cambios estructurales y de permeabilidad no afectaron al perfil de OMPs. Estos datos sugieren que la combinación de oxiclozanida y colistina podría ser una opción como nueva alternativa para el tratamiento contra infecciones de BGN Col-R. Esta actividad *in vitro* debe verse apoyada por los siguientes estudios *in vivo*, como el estudio de la eficacia terapéutica de esta combinación en modelos experimentales murinos de infección.

CAPÍTULO II. Artículo 3

Accepted Manuscript

The anthelmintic oxyclozanide restores the colistin activity in colistin-resistant Gram-negative bacilli

Rafael Ayerbe-Algaba , María Luisa Gil-Marqués ,
Andrea Miró-Canturri , Raquel Parra-Millán ,
María Eugenia Pachón-Ibáñez , Manuel Enrique Jiménez-Mejías ,
Jerónimo Pachón , Younes Smani

PII: S0924-8579(19)30186-4
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2019.07.006>
Reference: ANTAGE 5755

To appear in: *International Journal of Antimicrobial Agents*

Received date: 18 April 2019
Accepted date: 3 July 2019

Please cite this article as: Rafael Ayerbe-Algaba , María Luisa Gil-Marqués , Andrea Miró-Canturri , Raquel Parra-Millán , María Eugenia Pachón-Ibáñez , Manuel Enrique Jiménez-Mejías , Jerónimo Pachón , Younes Smani , The anthelmintic oxyclozanide restores the colistin activity in colistin-resistant Gram-negative bacilli, *International Journal of Antimicrobial Agents* (2019), doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2019.07.006>

This is a PDF file of an unedited manuscript that has been accepted for publication. As a service to our customers we are providing this early version of the manuscript. The manuscript will undergo copyediting, typesetting, and review of the resulting proof before it is published in its final form. Please note that during the production process errors may be discovered which could affect the content, and all legal disclaimers that apply to the journal pertain.



CAPÍTULO II. Artículo 3

ACCEPTED MANUSCRIPT

Title. The anthelmintic oxyclozanide restores the colistin activity in colistin-resistant Gram-negative bacilli

Authors. Rafael Ayerbe-Algaba^{1,2}, María Luisa Gil-Marqués^{1,2}, Andrea Miró-Canturri^{1,2}, Raquel Parra-Millán^{1,2}, María Eugenia Pachón-Ibáñez^{1,2}, Manuel Enrique Jiménez-Mejías^{1,2}, Jerónimo Pachón^{2,3*}, Younes Smani^{1,2*}.

Affiliations. ¹Clinical Unit of Infectious Diseases, Microbiology and Preventive Medicine, University Hospital Virgen del Rocío, Seville, Spain. ²Institute of Biomedicine of Seville (IBiS), University Hospital Virgen del Rocío/CSIC/University of Seville, Seville, Spain. ³Department of Medicine, University of Seville, Seville, Spain.

***Corresponding Authors:** *Younes Smani, Clinic Unit of Infectious Diseases, Microbiology and Preventive Medicine, Institute of Biomedicine of Seville (IBiS), University Hospital Virgen del Rocío, Av. Manuel Siurot s/n, 41013, Seville, Spain. Tel: +34-955923100, E-mail: ysmani-ibis@us.es.

*Jerónimo Pachón, Institute of Biomedicine of Seville (IBiS), University Hospital Virgen del Rocío, Av. Manuel Siurot s/n, 41013, Seville, Spain. Tel: +34-955923104, E-mail: pachon@us.es.

Running title: Oxyclozanide potentiates colistin effect against GNB

Abstract

Due to the significant increase in the antimicrobial resistance of Gram-negative bacilli (GNB), the development of non-antimicrobial therapeutic alternatives, which can be used together with the few and non-optimal available antimicrobial agents such as colistin, has become an urgent need. In this context, the desregulation of the bacterial cell wall could be a therapeutic alternative adjuvant to colistin. The aim of this study was to analyse the activity of oxyclozanide, an anthelmintic drug, in combination with colistin against colistin-susceptible (Col-S) and colistin-resistant (Col-R) GNB.

Three reference Col-S strains and 13 Col-R clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Klebsiella pneumoniae* were studied.

Microdilution assays and time-kill curves were performed to examine the activity of oxyclozanide in combination with colistin. Outer membrane proteins (OMPs) profile, membrane permeation and cell wall structure of Col-S and Col-R *A. baumannii*, *P. aeruginosa* and *K. pneumoniae* in presence of oxyclozanide were assessed by SDS-PAGE, fluorescence and transmission electron microscopy, respectively.

Oxyclozanide in combination with colistin increases the activity of colistin against Col-S and Col-R *A. baumannii*, *P. aeruginosa* and *K. pneumoniae*. Time-killing curves have showed synergistic activity between oxyclozanide and colistin against these bacterial isolates. Moreover, Col-R *A. baumannii*, *P. aeruginosa* and *K. pneumoniae* in presence of oxyclozanide present higher permeation and disruption in their cell wall than Col-S strains, without modifying their OMPs profile.

These data suggest that the combination of oxyclozanide and colistin may be a new alternative for the treatment of Col-R GNB infections.

Keywords

Drug repurposing; colistin-resistant; oxyclozanide; Gram-negative bacilli

1. Introduction

Few options of treatment of MDR Gram-negative bacilli (GNB) are present and last resort treatments such as colistin are no longer effective in an increasing number of cases, leading to a 28-day mortality of 43% in hospitalized patients with bacteremia, ventilator-associated or hospital acquired pneumonia, or urosepsis [1]. Although colistin currently retains significantly *in vitro* activity against most GNB, resistance to colistin is increasingly being reported among clinical isolates [2]. The SENTRY antimicrobial surveillance program carried out worldwide surveys in 2006-2009 and 2009-2011, and reported that resistance to colistin among GNB (*Acinetobacter* spp., *Pseudomonas aeruginosa*, and *Klebsiella* spp.) move from 0.1-1.5% to 0.7-3.6% [3,4]; probably because of the extensive and/or inadequate usage of colistin worldwide for treating infections with MDR Gram-negative bacteria. Therefore, the development of new strategic antimicrobial therapeutic approaches for use alone or together with one of the scarce but clinically relevant antibiotics, has become exigent. In this environment, “repurposing” (defined as investigating new uses for existing drugs) has gained renewed interest, as reflected by several recent studies [5]. Oxyclozanide, used in veterinary for treating fluke infections in ruminants [6], has exhibited activity against *Staphylococcus aureus* and *Clostridium difficile* and *Helicobacter pylori* probably due to disruption of their cell envelope [5,7]. Niclosamide, the lead compound of oxyclozanide, has also been identified as a potent anti-bacterial drug against *H. pylori* and *P. aeruginosa* by the inhibition of quorum sensing and various virulence genes, and by the reduction of elastase and pyocyanin levels [5].

Currently there is no study regarding the combination between oxyclozanide and colistin to restore the activity of colistin against GNB. The aim of this study was to determine the *in vitro* activity of oxyclozanide in combination with colistin against colistin-susceptible (Col-S) and colistin-resistant (Col-R) *A. baumannii*, *P. aeruginosa* and *K. pneumoniae* strains.

2. Materials and methods

2.1 Bacterial strains

Reference Col-S *A. baumannii* ATCC 17978, *P. aeruginosa* PAO1 and *K. pneumoniae* CECT 997 strains were used in this study. We also used 5 clinical Col-R *A. baumannii* strains isolated from a hospital outbreak in 2000 in Spain, 5 clinical Col-R *P. aeruginosa* strains isolated from patients with cystic fibrosis and one Col-S and 2 Col-R clinical *K. pneumoniae* strains.

2.2 *pmrA*, *pmrB*, *mgrB*, *phoP* and *phoQ* genes amplification and sequencing

In order to investigate the possible contribution of *pmrAB*, *mgrB* and *phoPQ* to the colistin resistance in *A. baumannii*, *P. aeruginosa* and *K. pneumoniae*, these genes were analyzed to detect any genetic alteration as previously described (Table S1) [8].

2.3 *In vitro* susceptibility testing.

MICs of colistin (Sigma, Spain), oxyclozanide (Sigma, Spain) and colistin plus 2 mg/L of oxyclozanide against Col-S and Col-R references and clinical *A. baumannii*, *P. aeruginosa* and *K. pneumoniae* strains were determined in two independent experiments by broth microdilution assay as previously described [8], and according to CLSI (*A. baumannii* and *P. aeruginosa*) and EUCAST (*K. pneumoniae*) recommendations [9,10].

Two milligrams per liter oxyclozanide has been used in this experiment because checkerboard assays showed higher synergy with colistin (data not shown).

2.4 Checkerboard assay.

The assay was performed on a 96-well plate. Expanded details of this assay are given in supplementary data.

2.5 Time-kill kinetic assays.

Time-kill curves of *A. baumannii* ATCC 17978 and Col-R #14, *P. aeruginosa* PAO1 and Col-R M4, and *K. pneumoniae* CECT 997 and Col-R Kp21 strains with starting inoculum of 1×10^6 CFU/mL, conducted on Ca-MHB, in presence of 2 mg/L oxyclozanide and colistin (sub-MIC) alone or in combination were performed in two independent experiments as previously described [8]. Oxyclozanide was considered synergistic when in combination with colistin reduced the bacterial concentration ≥ 2 log CFU/mL with respect to colistin alone.

2.6 Analysis of outer membrane proteins (OMPs) by SDS-PAGE

Bacterial cells were grown in LB broth to the logarithmic phase, incubated with 2 mg/L oxyclozanide for 4 or 24 h and lysed by sonication. The OMP profiles were determined by sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) as previously described [11].

2.7 Transmission electron microscopy visualization

Bacterial cells were grown in LB broth and incubated in absence or presence of 2 µg/mL oxytetracycline for 24 h. Pellet was harvested by ultracentrifugation at 4600g for 15 min and resuspended in 2.5% glutaraldehyde containing 0.1 M cacodylate buffer in order to fix the samples. After three rounds of centrifugation in the same condition described before and washed with 0.1 M cacodylate buffer, pellet was included in agarose resin by automatic processor, and ultrathin sections were obtained by ultramicrotome. These sections were placed into a grid to visualize by Zeiss Libra 120 transmission electron microscope (Zeiss, Germany).

2.8 Membrane permeability assays

Bacterial cells were grown in LB broth and incubated in absence or presence of 2 mg/L oxytetracycline for 24 h. Pellet was harvested by ultracentrifugation at 4600g for 15 min. Bacterial cells were washed with PBS 1X and after centrifugation in the same condition described before, pellet was resuspended in 100 µL of PBS 1X containing 10 µL of Ethidium Homodimer-1 (EthD-1) (Invitrogen, USA). After 10 min of incubation, (i) 10 µL of pellet was placed into a slide to visualize by Leica fluorescence microscope (DM-6000; Leica Microsystems Wetzlar GmbH, Germany), and (ii) 100 µL was placed into a 96-well plate to measure fluorescence at 0, 10, 15, 20, 30, 40, 70, 100 and 130 min using Typhoon FLA 9000 laser scanner (GE Healthcare Life Sciences, USA) and quantified by ImageQuant TL software (GE Healthcare Life Sciences, USA).

3. Results

3.1 Colistin MIC and resistance mechanisms

The MIC for the Col-R *A. baumannii*, *P. aeruginosa* and *K. pneumoniae* strains ranged from 4 to > 512 mg/L, while those for the susceptible reference strains were 0.5-1 mg/L.

The analysis of the *pmrA*, *pmrB*, *mgrB*, *phoP*, and *phoQ* sequences showed that Col-R *A. baumannii* strains presented only different amino acids substitution in *pmrB* [8], Col-R *P. aeruginosa* strains presented different amino acids substitution in *pmrA*, *pmrB*, *phoP* and *phoQ*, deletion nucleotide of *pmrB* or nonstop codon insertion in *phoP*, and Col-R *K. pneumoniae* strains presented IS1 transposase insertion in *mgrB* or different amino acids substitution in *pmrA* and *pmrB*, without substituting amino acid in *phoP* and *phoQ* (Table S2).

3.2 In vitro activity of oxyclozanide in combination with colistin against Col-S and Col-R *A. baumannii*, *P. aeruginosa* and *K. pneumoniae*.

Oxyclozanide alone or in combination with colistin was tested against reference and clinical isolates of Col-S and Col-R *A. baumannii*, *P. aeruginosa* and *K. pneumoniae*. The MICs are shown in Table 1. Oxyclozanide alone showed higher MIC from 128 to 512 mg/L for Col-S and Col-R *A. baumannii*, *P. aeruginosa* and *K. pneumoniae*. Oxyclozanide at 2 mg/L, in combination with colistin, increased significantly the activity of colistin against all Col-S and Col-R strains; being more active against Col-R strains. This concentration of oxyclozanide was chosen based on data of checkerboard assays, which 2 mg/L of oxyclozanide has been the most common synergistic concentration with colistin against Col-S and Col-R *A. baumannii*, *P. aeruginosa* and *K. pneumoniae*.

3.3 Time-killing curves

We examined the ability of oxyclozanide in combination with colistin to kill Col-S (ATCC 17978) and Col-R (#14) *A. baumannii* strains, Col-S (PAO1) and Col-R (M4) *P. aeruginosa* strains, and Col-S (CECT 997) and Col-R (Kp21) *K. pneumoniae* strains

time course assays. Two milligrams per liter oxyclozanide in combination with 0.25 mg/L colistin, a colistin sub-MIC of ATCC 17978 strain, showed in the first 8 h no synergistic activity with respect to colistin alone, followed by later synergistic activity decreasing the bacterial cell count by 4.91 log CFU/mL with respect to colistin alone at 24 h. In the case of PAO1 and CECT 997 strains, 2 mg/L oxyclozanide in combination with 0.5 and 0.25 mg/L colistin, a colistin sub-MIC of PAO1 and CECT 997 strains, respectively, no showed synergistic activity with respect to colistin alone during 24 h (Table 2).

Regarding the Col-R strains, 2 mg/L oxyclozanide in combination with 4, 4 and 16 mg/L colistin, a colistin sub-MIC of #14, M4 and PAO1 and Kp21 strains, respectively, showed higher synergistic activity, decreasing the bacterial cell count with respect to colistin alone after 24 h by 6.43, 3.7 and 3.5 log CFU/mL, respectively (Table 2). In a control experiment, 2 mg/L oxyclozanide had no effect on the growth of Col-S and Col-R *A. baumannii*, *P. aeruginosa* and *K. pneumoniae* (Table 2).

3.4 Oxyclozanide effect on the OMPs profile

Figure S1 illustrates the profile of OMPs of *A. baumannii* strains (ATCC 17978 and #14), *P. aeruginosa* strains (PAO1 and M4), and *K. pneumoniae* (CECT 997 and Kp21) strains in absence or presence of 2 mg/L oxyclozanide incubated at 4 h or 24 h. No changes on the profile of OMPs have been observed in all conditions, suggesting that oxyclozanide did not alter the protein expression of OMPs.

3.5 Oxyclozanide effect on the bacterial permeability

To study the effect of oxyclozanide on the bacterial membrane permeability, Col-S and Col-R of *A. baumannii*, *P. aeruginosa* and *K. pneumoniae* strains were treated with 2

mg/L oxyclozanide and incubated with EthD-1. Fluorescence microscopy analysis showed a large increase cellular fluorescence in Col-S and Col-R of *A. baumannii* and *P. aeruginosa* in presence of oxyclozanide when compared untreated cells. This increase was more present in Col-R than Col-S strains. Something similar happened with *K. pneumoniae*, although in this case the increase fluorescence was milder in Col-S and Col-R strains (Fig. 1A). Quantitatively, 2 h of fluorescence monitoring by Typhon Scanner confirm the results of fluorescence microscopy which oxyclozanide increase the permeability of Col-S and Col-R of *A. baumannii* and *P. aeruginosa*, being Col-R strains more permeable. In contrast, mild increase was observed in Col-S and Col-R *K. pneumoniae* strains. In the control condition, no fluorescence was observed. These data suggest that oxyclozanide affects the bacterial permeability.

3.6 Oxyclozanide effect on the integrity of bacterial cell envelope

Based on the observed effect of oxyclozanide on the membrane permeability, we hypothesized that oxyclozanide may disrupts the integrity of the cell envelope of Col-S and Col-R *A. baumannii*, *P. aeruginosa* and *K. pneumoniae*. For this reason, we analysed the structure of the cell envelope of these pathogens by the transmission electron microscopy. We observed that oxyclozanide disrupts in different levels the morphology of the bacterial membrane in all studied strains when compared with strains without treatment with oxyclozanide. This disorder seems to be partial and not around the entire bacterial membrane (Fig. S2).

4. Discussion

This study showed that oxyclozanide increases the activity of colistin against Col-S and Col-R *A. baumannii*, *P. aeruginosa* and *K. pneumoniae*, being more active against Col-

R strains. It is noteworthy to mention that the use of oxyclozanide alone did not affect the growth of Col-S and Col-R *A. baumannii*, *P. aeruginosa* and *K. pneumoniae* strains, which is consistent with previously published data in which oxyclozanide did not present bactericidal nor bacteriostatic effect [7]. Previous independent work showed that the lead compound niclosamide can potentiate the activity of colistin against Col-S and Col-R *A. baumannii* and *K. pneumoniae* clinical isolates [8]. However, to date, the question is how oxyclozanide acts on these pathogens.

Oxyclozanide showed an MIC range against Col-S and Col-R of *A. baumannii*, *P. aeruginosa* and *K. pneumoniae* from 128 to 256 mg/L. Due to its use as an anthelmintic agent [6], no susceptibility breakpoints for oxyclozanide are defined. However, the MIC values obtained are in accordance to those reported analysing the *in vitro* activity of oxyclozanide, and its lead compound niclosamide against *A. baumannii*, *P. aeruginosa* and *K. pneumoniae* [7,8].

Besides the fact that oxyclozanide alone did not present bactericidal and bacteriostatic effect, more important is that its combination with colistin potentiates the effect of colistin alone against clinical Col-S and Col-R strains using time-killing assay. The *in vitro* activity observed with oxyclozanide in combination with colistin suggests there is strong possibility to repurpose for antibacterial use against MDR GNB. These results are in accordance to the ones reported by previous studies in which the combination of oxyclozanide and other anthelmintic drugs such as niclosamide and closantel, with colistin reversed the colistin resistance and enhanced the colistin activity against *A. baumannii*, *P. aeruginosa* and *K. pneumoniae* [8,12-14]. We would also like to mention, that no more synergistic effect with oxyclozanide in combination with other antimicrobial agents such as imipenem, ciprofloxacin and vancomycin (data not shown). The combination of colistin with other antimicrobials agents has been proved to

be useful, both *in vitro* and *in vivo*, against these MDR GNB [2], as other examples of combinations.

Despite the fact that oxyclozanide does not appear to inhibit the growth of *A.*

baumannii, *P. aeruginosa* and *K. pneumoniae*, we showed, for the first time, that oxyclozanide disrupts partly the cell envelope of the studied pathogens. This data is consistent with previously published reports, showing that oxyclozanide causes significant bacterial cell envelope damage of *S. aureus* and *H. pylori* [5]. It is well known that colistin target the bacterial outer membrane [2] and we suggest that the disruption of the integrity of the bacterial cell envelope allow colistin to bind more to its target independently of the colistin resistance level. Evidence supports this hypothetical model in which we demonstrated that oxyclozanide did not modify the profile of OMPs nor their expression.

It should be noted that Col-R *K. pneumoniae* was less permeable than *A. baumannii* and *P. aeruginosa* after oxyclozanide treatment. This difference might explain the lower fold change of colistin MIC after incubation with oxyclozanide observed for Kp21 strain (8-fold change). For #14 and M4 strains, the fold change was >32 and >64, respectively.

On the other hand, oxyclozanide is known for its poor absorption and bioavailability [15]. This characteristic is shared by other salicylanilides drugs [15]. Two previous studies have reported that a single oral dose of 15 mg/kg of oxyclozanide in Goat and Sheep to treat trematode infections resulted in a media of plasma oxyclozanide concentration of 7 and 19 mg/L, respectively [16,17]. These values exceed 3.5 and 9-folds, respectively, the concentration of oxyclozanide used in our study. Unfortunately, extensive binding to plasma proteins has been reported for oxyclozanide and other salicylanilides, which currently limits their systemic and intravenous applications [15].

Possible need for new formulations to increase their bioavailability should be taken into account in the preclinical development of this approach. Of note, positive results have been seen with niclosamide derivative O-alkylamino-tethered, which potent antibacterial effect against carbapenemase producing and colistin resistant Enterobacteriaceae isolates has been observed [18]. Moreover, inhalable nanosuspension and salt form of niclosamide, niclosamide ethanolamine, have presented better solubility profile and inhibited the *P. aeruginosa quorum sensing* [19, 20].

5. Conclusions

Oxyclozanide has potentiated the effect of colistin and Col-S and Col-R *A. baumannii*, *P. aeruginosa* and *K. pneumoniae* strains. This effect might be due to the disruption of their cell envelope. These results provide new insights into the use of oxyclozanide in combination with colistin as new alternative for the treatment of the infections caused by GNB. Further data of pharmacokinetics/pharmacodynamics and *in vivo* therapeutic efficacy are required to investigate the usefulness of this alternative.

Acknowledgments

We thank Dr. Antonio Oliver and Dr. Alvaro Pascual for the kind gift of the *P. aeruginosa* and *K. pneumoniae* clinical isolates, respectively.

Declarations

Fundings: This study was supported by the Instituto de Salud Carlos III, Proyectos de Investigación en Salud (grants PI15/01358 and PI16/01378) and by Plan Nacional de I+D+i 2013-2016 and Instituto de Salud Carlos III, Subdirección General de Redes y Centros de Investigación Cooperativa, Ministerio de Ciencia, Innovación y

Universidades, Spanish Network for Research in Infectious Diseases (REIPI RD16/0016/0009) - co- financed by European Development Regional Fund “A way to achieve Europe”, Operative program Intelligent Growth 2014-2020. Younes Smani is supported by the Subprograma Miguel Servet Tipo I from the Ministerio de Economía y Competitividad of Spain (CP15/01358).

Competing Interests: No conflicts of interest to declare.

Ethical Approval: Not required

References

- [1]. Paul M, Daikos GL, Durante-Mangoni E, Yahav D, Carmeli Y, Benattar YD, et al. Colistin alone versus colistin plus meropenem for treatment of severe infections caused by carbapenem-resistant Gram-negative bacteria: an open-label, randomised controlled trial. *Lancet Infect Dis* 2018;18:391-400.
- [2]. Perez F, El Chakhtoura NG, Yasmin M, Bonomo RA. Polymyxins: to combine or not to combine?. *Antibiotics* 2019;8. pii: E38.
- [3]. Gales AC, Jones RN, Sader HS. Contemporary activity of colistin and polymyxin B against a worldwide collection of Gram-negative pathogens: results from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (2006–09). *J Antimicrob Chemother* 2011;66:2070-2074.
- [4]. Sader SH, Farrell DJ, Flamm RK, Jones RN. Antimicrobial susceptibility of Gram-negative organisms isolated from patients hospitalized in intensive care units in United States and European hospitals (2009–2011). *Diagn Microbiol Infect Dis* 2014;78:443-448.

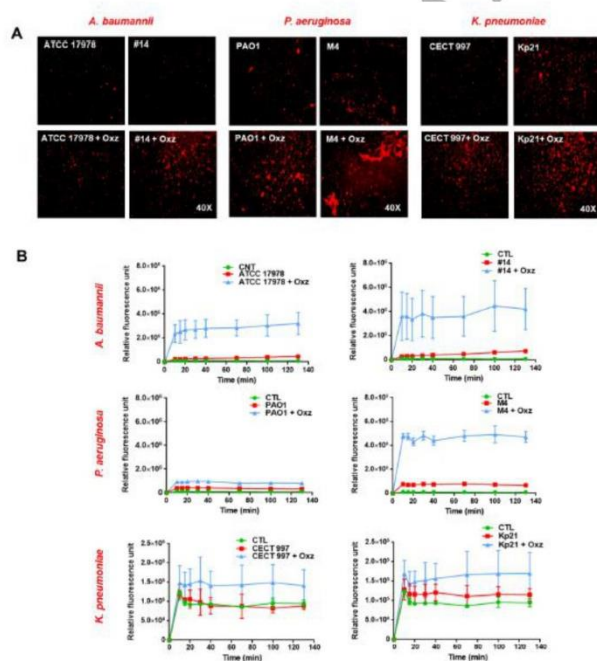
- [5]. Miró-Canturri A, Ayerbe-Algaba R, Smani Y. Drug repurposing for the treatment of bacterial and fungal infections. *Front Microbiol* 2019;10:41.
- [6]. Sanabria R, Moreno L, Alvarez L, Lanusse C, Romero J. Efficacy of oxyclozanide against adult *Paramphistomum leydeni* in naturally infected sheep. *Vet Parasitol* 2014;206:277-81.
- [7]. Rajamuthiah R, Fuchs BB, Conery AL, Kim W, Jayamani E, Kwon B, et al. Repurposing Salicylanilide anthelmintic drugs to combat drug resistant *Staphylococcus aureus*. *PLoS One* 2015;10:e0124595.
- [8]. Ayerbe-Algaba R, Gil-Marqués ML, Jiménez-Mejías ME, Sánchez-Encinales V, Parra-Millán R, Pachón-Ibáñez ME, et al. Synergistic activity of niclosamide in combination with colistin against colistin-susceptible and colistin-resistant *Acinetobacter baumannii* and *Klebsiella pneumoniae*. *Front Cell Infect Microbiol* 2018;8:348.
- [9]. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. Twenty-Sixth Informational Supplement. Document M100-S26. Wayne, PA: CLSI; 2016.
- [10]. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. European antimicrobial breakpoints. Basel, Switzerland: EUCAST; 2016.
- [11]. Parra Millán, Vila-Farrés X, Ayerbe-Algaba R, Varese M, Sánchez-Encinales V, Bayó N, et al. Synergistic activity of an OmpA inhibitor and colistin against colistin-resistant *Acinetobacter baumannii*: mechanistic analysis and *in vivo* efficacy. *J Antimicrob Chemother* 2018;73:3405-3412.
- [12]. Domalaon R, De Silva PM, Kumar A, Zhanel GG, Schweizer F. The anthelmintic drug niclosamide synergizes with colistin and reverses colistin resistance in Gram-negative bacilli. *Antimicrob Agents Chemother* 2019;63. pii: e02574-18.

- [13]. Tran TB, Cheah SE, Yu HH, Bergen PJ, Nation RL, Creek DJ, et al. Anthelmintic closantel enhances bacterial killing of polymyxin B against multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *J Antibiot (Tokyo)* 2016;69:415-421.
- [14]. Domalaon R, Okunnu O, Zhanel GG, Schwizer F. Synergistic combinations of anthelmintic salicylanilides oxyclozanide, rafoxanide, and closantel with colistin eradicates multidrug-resistant colistin-resistant Gram-negative bacilli. *J Antibiot (Tokyo)* 2019 Apr 26. doi: 10.1038/s41429-019-0186-8. [Epub ahead of print]
- [15]. Swan GE. The pharmacology of halogenated salicylanilides and their anthelmintic use in animals. *J S Afr Vet Assoc* 1999;70:61-70.
- [16]. Gokbulut C, Yalinkilinc HS, Aksit D, Veneziano V. Comparative pharmacokinetics of levamisole-oxyclozanide combination in sheep and goats following per os administration. *Can J Vet Res* 2014;78:316-20.
- [17]. Mohammed-Ali NAK, Bogan JA. The pharmacodynamics of the flukicidal salicylanilides rafoxanide closantel and oxyclozanide. *J Vet Pharmacol Therapeut* 1987;10:127-133.
- [18]. Xu J, Pachón-Ibáñez ME, Cebrero-Cangueiro T, Chen H, Sánchez-Céspedes J, Zhou J. Discovery of niclosamide and its O-alkylamino-tethered derivatives as potent antibacterial agents against carbapenemase-producing and/or colistin resistant *Enterobacteriaceae* isolates. *Bioorg Med Chem Lett* 2019;29:1399-1402.
- [19]. Costabile G, d'Angel I, Rampion G, Bondi R, Pompili B, Ascenzioni F, et al. Toward repositioning niclosamide for antivirulence therapy of *pseudomonas aeruginosa* lung infections: development of inhalable formulations through nanosuspension technology. *Mol Pharmaceutics* 2015;12:2604-2617.

[20]. Imperi F, Massai F, Ramachandran Pillai C, Longo F, Zennaro E, et al. New life for an old drug: the anthelmintic drug niclosamide inhibits *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing. Antimicrob Agents Chemother 2013;57:996-1005.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Oxyclozanide effect on the bacterial permeability. The membrane permeabilization by oxyclozanide in *A. baumannii* ATCC 17978 and #14 strains, *P. aeruginosa* PAO1 and M4 strains, and *K. pneumoniae* CECT 997 and Kp21 strains in absence and presence of oxyclozanide (2 mg/L) incubated for 24 h, was visualized by fluorescence microscopy (A), and quantified by Typhon Scanner (B). Oxz: oxyclozanide.



CAPÍTULO II. Artículo 3

ACCEPTED MANUSCRIPT

Table 1. Determination of MIC of oxyclozanide and colistin alone or in combination against Col-S and Col-R *A. baumannii*, *P. aeruginosa* and *K. pneumoniae*.

Pathogen	Strains	MIC of Col (mg/L)	MIC of Oxz (mg/L)	MIC of Col (mg/L) in presence of Oxz (2 mg/L)	Fold change
<i>A. baumannii</i>	ATCC 17978	0.5	256	0.06	8
	#11	256	256	1	256
	#14	4	128	<0.125	>32
	#17	4	128	0.25	16
	#21	128	128	16	8
	#113	16	256	<2	>8
<i>P. aeruginosa</i>	PAO1	1	512	0.25	4
	M1	>512	256	32	>16
	M2	>512	128	64	>8
	M3	64	128	≤4	≤16
	M4	16	128	<0.25	>64
	M5	>512	128	8	>64
<i>K. pneumoniae</i>	CECT 997	0.5	256	0.25	2
	Kp07	2	512	1	2
	Kp21	32	512	4	8
	Kp29	16	512	4	4

Values in bold indicate a difference in susceptibility of ≥2-fold. Oxz: oxyclozanide; Col: colistin.

CAPÍTULO II. Artículo 3

ACCEPTED MANUSCRIPT

Table 2. Analysis of time-kill curves of Col-S and Col-R *A. baumannii*, *P. aeruginosa* and *K. pneumoniae* alone and in the presence of colistin, oxytetracycline and colistin plus oxytetracycline during 24 h.

Pathogen	Colisitrn susceptibility profile	Condition	Δ Log CFU/mL at 4 h	Δ Log CFU/mL at 8 h	Δ Log CFU/mL at 24 h
A. baumannii	Col-S	ATCC 17978	1.87	2.33	3.21
		ATCC 17978+Oxz	+1.85	2.18	2.12
		ATCC 17978+Col	-3.69	-3.1	2.55
		ATCC1797+Col+Oxz	-1.53	-2.46	-2.36
	Col-R	#14	1.5	2.67	2.79
		#14+Oxz	1.3	2.72	2.66
		#14+Col	-1.62	-3.32	0.93
		#14+Col+Oxz	-2.29	-3.82	-5.5
P. aeruginosa	Col-S	PAO1	0.88	2.42	3.15
		PAO1+Oxz	1.14	2.47	3.01
		PAO1+Col	-4.45	-2.35	0.04
		PAO1+Col+Oxz	-2.74	-3.11	0.65
	Col-R	M4	-0.32	1.16	2.7
		M4+Oxz	-0.42	-0.42	2.17
		M4+Col	-3.96	-2.4	-0.07
		M4+Col+Oxz	-5.26	-6.04	-3.77
K. pneumoniae	Col-S	CECT 997	1.6	3.08	3.55
		CECT 997+Oxz	1.29	2.9	3.44
		CECT 997+Col	-2.73	-3.66	0.36
		CECT 997+Col+Oxz	-1.81	-4.12	0.64
	Col-R	Kp21	1.48	2.87	3.12
		Kp21+Oxz	1.44	3.03	3.11
		Kp21+Col	-0.8	0.51	2.36
		Kp21+Col+Oxz	-1.81	-1.94	-1.14

Values in bold indicate the presence of synergy when the combination colistin and oxytetracycline reduced the bacterial concentration ≥ 2 log CFU/mL with respect to colistin alone. Δ Log CFU/mL, log CFU/mL at 4, 8 or 24 h - log CFU/mL at 0 h. Oxz: oxytetracycline; Col: colistin; Col-S: colistin-susceptible; Col-R: colistin-resistant.

CAPÍTULO II. Artículo 3

Supplementary data

2. Materials and methods

2.4 Checkerboard assay.

The assay was performed on a 96-well plate as previously described [1]. Expanded details of this assay is given in supplemental material. Colistin was 2-fold serially diluted along the x axis, whereas oxyclozanide was 2-fold serially diluted along the y axis to create a matrix, where each well consists of a combination of both agents at different concentrations. Bacterial cultures grown overnight were then diluted in saline to 0.5 McFarland turbidity, followed by 1:50 further dilution in cation-adjusted Moeller Hinton Broth (Ca-MHB) and inoculation on each well to achieve a final concentration of approximately 5×10^5 CFU/ml. The 96-well plates were then incubated at 37°C for 18 h and examined for visible turbidity. The fractional inhibitory concentration (FIC) of the colistin was calculated by dividing the MIC of colistin in the presence of oxyclozanide by the MIC of colistin alone. Similarly, the FIC of oxyclozanide was calculated by dividing the MIC of oxyclozanide in the presence of colistin by the MIC of oxyclozanide alone. The FIC index was the summation of both FIC values. FIC index values of ≤ 0.5 was interpreted as synergistic.

CAPÍTULO II. Artículo 3

Table S1. Primers list used in this study

Pathogen	Gene	Primer name	Sequence	Amplicon size (bp)	Reference
<i>A. baumannii</i>	<i>pmrAB</i>	pmrAB-F	ATGACAAAAATCTTGATGAT	1,335	2
		pmrAB-R	TCACGCTCTTGTTTCATGTA		
	<i>pmrAB</i>	pmrAB-F	TGCAGGACCTCTACGAACTG	770	3
		pmrAB-R	AGCTCGGCAACCAGTTGATC		
		pmrAB-F1	TTCGATCTCGACGAACTGCA	874	
		pmrAB-R1	ACCATGAACCTGCTGCTGTT		
		pmrAB-F2	TGCTGTCGAGCCTCAACCTG	690	
		pmrAB-R2	CATCGACAAGGACATCGAGC		
		pmrAB-F3	TTGATGGAGCAGATCCTGCT	689	
		pmrAB-R3	AAGATGATCCGTTACTACGA		
<i>P. aeruginosa</i>	<i>phoPQ</i>	phoP-F	GACAACAACACCAAGCTGTT	593	3
		phoP-R	TGAGGATCAGGATCGGGAAG		
		phoQ-F1	AGCGAATACCACCACGACC	587	
		phoQ-R1	GAGCATCAGACGGATGCGCA		
		phoQ-F2	TGATGGAACAGCTCTATCCC	633	
		phoQ-R2	TTGAGCAGGCTCTCGAACT		
		phoQ-F3	GAGGAGTTCTTCGTGTTTCA	606	
		phoQ-R3	GTCGCGATAGACCTTGTTCA		
		phoQ-F4	AGCAGATAGGCTATCAGTTG	603	
		phoQ-R4	CCACTGAACATCCGCTCGAA		
	<i>pmrAB</i>	pmrA-F	CGCAGGATAATCTGTTCTCCA	808	2
		pmrA-R	GGTCCAGGTTTCAGTTGCAA		
		pmrB-F1	GCGAAAAGATTGGCAAATCG	659	
		pmrB-R1	GGAAATGCTGGTGGTCATCTGA		
		pmrB-F2	CCCTGAATCAGTTGGTTTC	714	
		pmrB-R2	ATCAATGGGTGCTGACGTT		
<i>K. pneumoniae</i>	<i>mgrB</i>	mgrB-extF	AAGGCGTTCATTCTACCACC	253	4
		mgrB-extR	TTAAGAAGGCCGTGCTATCC		
	<i>phoPQ</i>	phoP-F	GAGCGTCAGACTACTATCGA	912	2
		phoP-R	GTTTTCCCATCTCGCCAGCA		
		phoQ-F1	CCACAGGACGTCATCACCA	636	2
		phoQ-R1	AGCTCCACACCATATAGCTG		This study
		phoQ-F2	GAACAGGGCGACGACTCTG	617	This study
		phoQ-R2	TGAGAGCGGAAGTCAGGCT		
		phoQ-F3	GATGCTGGAGCAGATAAGCC	621	This study
		phoQ-R3	GCAGGTGTCTGACAGGGATT		

CAPÍTULO II. Artículo 3

Table S2. Colistin MICs and description of Col-S and Col-R *A. baumannii*, *P. aeruginosa* and *K. pneumoniae* strains used in this study.

Pathogen	Strain	Reference/Source	Description	Colistin MIC (mg/L)
<i>A. baumannii</i>	ATCC 17978	4	Colistin-susceptible reference strain	0.5
	#11	5	PDR clinical isolate with R263C amino acid substitution of <i>pmrB</i>	256
	#14	5	PDR clinical isolate with R263C amino acid substitution of <i>pmrB</i>	4
	#17	5,6	PDR clinical isolate with R263C amino acid substitution of <i>pmrB</i>	4
	#21	5,6	PDR clinical isolate with P170Q amino acid substitution of <i>pmrB</i>	128
	#113	5,6	PDR clinical isolate with L5S, R207C and G426S amino acids substitution of <i>pmrB</i>	16
<i>P. aeruginosa</i>	PAO1	7	Colistin-susceptible reference strain	1
	M1	8	PDR clinical isolate with L70R aminoacids substitution of <i>pmrA</i> and V184I; G220D; R286Q; and Y344H aminoacids substitutions of <i>pmrB</i>	>512
	M2	8	PDR clinical isolate with L70R and D103Y aminoacids substitutions of <i>pmrA</i> , Y344H aminoacids substitution of <i>pmrB</i> and 422G nonstop codon insertion in <i>phoQ</i>	>512
	M3	8	PDR clinical isolate with L70R and D103Y aminoacids substitutions of <i>pmrA</i> , Y344H aminoacids substitution of <i>pmrB</i> , N187S aminoacid substitution in <i>phoP</i> and 422G nonstop codon insertion in <i>phoQ</i>	64
	M4	8	PDR clinical isolate with L70R aminoacids substitution of <i>pmrA</i> , R286Q; L322P and Y344H deletion nucleotides (D aminoacid 46) of <i>pmrB</i> and L50P aminoacids substitution of <i>phoQ</i>	16
	M5	8	PDR clinical isolate with L70R aminoacids substitution of <i>pmrA</i> and V5A; L171P; R286Q; L322P and Y344H aminoacids substitutions of <i>pmrB</i>	>512
<i>K. pneumoniae</i>	CECT 997	9	Colistin-susceptible reference strain	0.5
	Kp07	2	Colistin-susceptible clinical isolate	2
	Kp21	2	Clinical isolate containing IS1 transposase insertion at nucleotide 22 of <i>mgrB</i>	32
	Kp29	2	Clinical isolate with a G56E and M215I amino acids substitution of <i>pmrA</i> , and R63P; S68N and R255G amino acids substitution of <i>pmrB</i>	16

PDR: pandrug-resistant.

CAPÍTULO II. Artículo 3

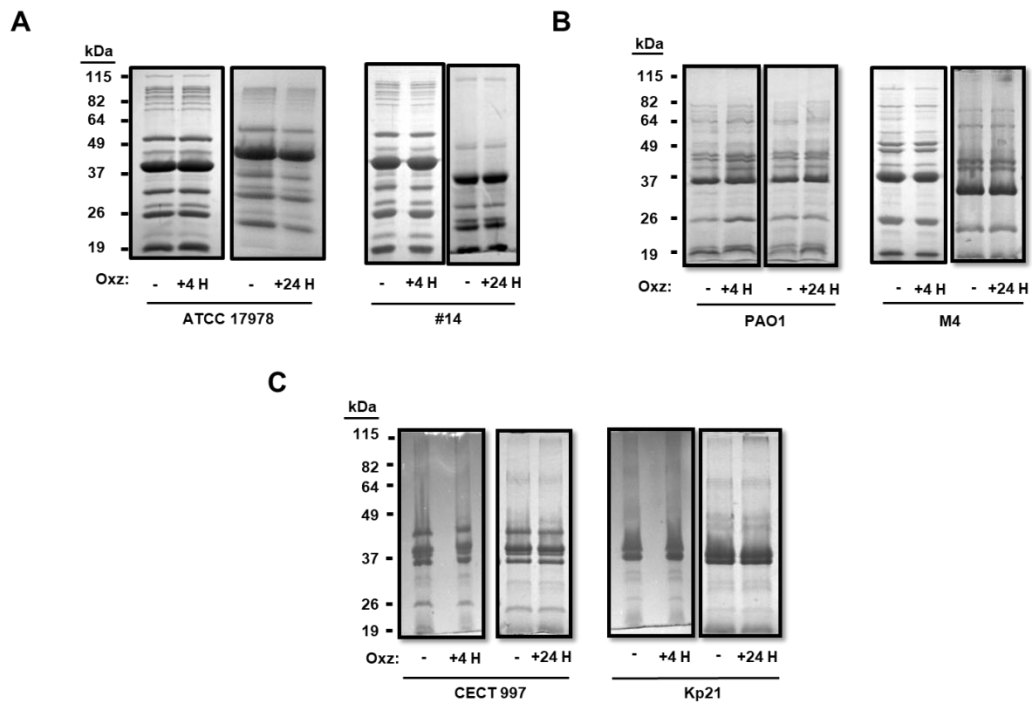


Figure S1. Oxyclozanide produce no changes on the OMPs profile of Col-S and Col-R *A. baumannii*, *P. aeruginosa* and *K. pneumoniae*. Protein profile of OMPs of *A. baumannii* ATCC 17978 and #14 (A), *P. aeruginosa* PAO1 and M4 strains (B), and *K. pneumoniae* CECT 997 and Kp21 strains (C) strains in absence and presence of oxyclozanide (2 mg/L) incubated for 4 h or 24 h. Oxz: oxyclozanide. OMPs: outer membrane proteins.

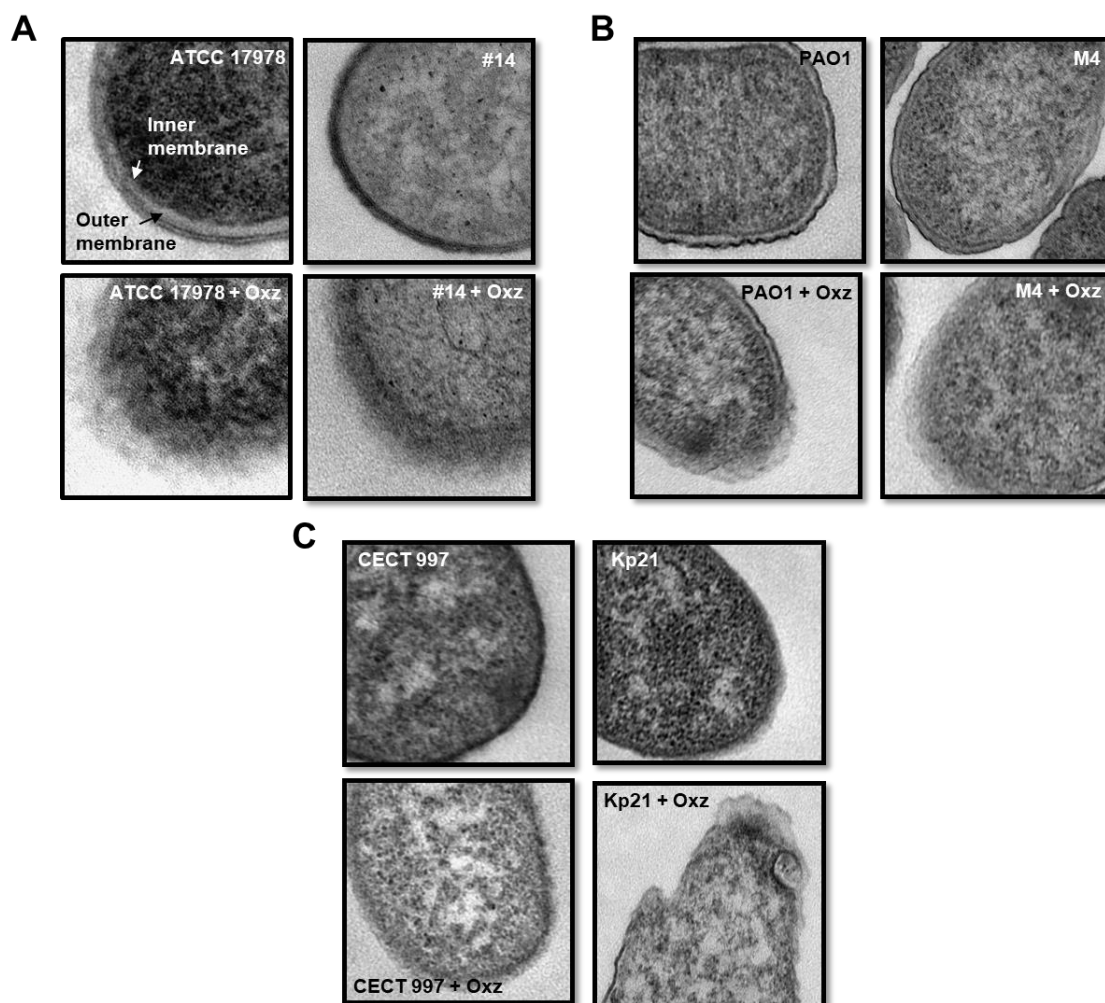


Figure S2. Oxyclozanide effect on the integrity of bacterial cell envelope. TEM images of *A. baumannii* ATCC 17978 and #14 strains (A), *P. aeruginosa* PAO1 and M4 strains (B), and *K. pneumoniae* CECT 997 and Kp21 strains (C) in absence and presence of oxyclozanide (2 mg/L) incubated for 24 h. Arrows indicate the inner and outer membranes. Oxz: oxyclozanide. TEM: transmission electron microscopy.

CAPÍTULO II. Artículo 4

References

- [1] Stokes JM, MacNair CR, Ilyas B, French S, Côté JP, Bouwman C, et al. Pentamidine sensitizes Gram-negative pathogens to antibiotics and overcomes acquired colistin resistance. *Nat Microbiol* 2017;2:17028.
- [2] Ayerbe-Algaba R, Gil-Marqués ML, Jiménez-Mejías ME, Sánchez-Encinales V, Parra-Millán R, Pachón-Ibáñez ME, et al. Synergistic activity of niclosamide in combination with colistin against colistin-susceptible and colistin-resistant *Acinetobacter baumannii* and *Klebsiella pneumoniae*. *Front Cell Infect Microbiol* 2018;8:348.
- [3] Young L, Kwan Soo K. Mutations and expression of PmrAB and PhoPQ related with colistin resistance in *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2014;78:271-276.
- [4] Baumann P, Doudoroff M, Stanier RY. A study of the Moraxella group. II. Oxidative-negative species (genus *Acinetobacter*). *J Bacteriol* 1968;95:1520-1541.
- [5] Valencia R, Arroyo LA, Conde M, Aldana JM, Torres MJ, Fernández-Cuenca F, et al. Nosocomial outbreak of infection with pan-drug-resistant *Acinetobacter baumannii* in a tertiary care university hospital. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2009;30:257-263.
- [6] López-Rojas R, García-Quintanilla M, Labrador-Herrera G, Pachón J, McConnell MJ. Impaired growth under iron-limiting conditions associated with the acquisition of colistin resistance in *Acinetobacter baumannii*. *Int J Antimicrob Agents* 2016;47:473-477.
- [7] Holloway IW. Genetic recombination in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Gen Microbiol* 1955;13:572-681.

CAPÍTULO II. Artículo 4

- [8] Maciá MD, Mena A, Borrell N, Pérez JL, Oliver A. Increased susceptibility to colistin in hypermutable *Pseudomonas aeruginosa* strains from chronic respiratory infections. *Antimicrob Agents Chemother* 2007;51:4531-4532.
- [9] Reading C, Cole M. Clavulanic acid: a beta-lactamase-inhibiting beta-lactam from *Streptomyces clavuligerus*. *Antimicrob Agents Chemother* 1977;11:852-857.

VI. DISCUSIÓN GENERAL

DISCUSIÓN GENERAL

La resistencia antimicrobiana supone una amenaza cada vez mayor para la salud pública mundial y requiere medidas por parte de todos los sectores del gobierno y la sociedad. Esta preocupación radica en la aparición de nuevos mecanismos de resistencia que se propagan a nivel mundial, lo que pone en peligro la eficacia de la prevención y el tratamiento de una serie cada vez mayor de infecciones por bacterias, entre las que se encuentran de forma subrayada especies de BGN, con el consiguiente aumento de la discapacidad y las muertes, y la prolongación de la enfermedad. De este problema surge una urgente necesidad de desarrollar nuevas moléculas con capacidad antibiótica y/o anti-virulencia, ya sean eficaces en tratamientos en monoterapia como adyuvantes al tratamiento antimicrobiano.

En este contexto, el trabajo de esta Tesis Doctoral está enfocado en el estudio sobre la eficacia de nuevos compuestos, ya sean péptidos de nueva creación o moléculas reposicionadas, con diana sobre la membrana bacteriana, para el tratamiento de las infecciones causad por BGN.

Capítulo 1: Estudio del mecanismo de inhibición de OmpA por el AOA-2 y optimización de sus derivados en el impacto sobre la virulencia de los BGN.

Una de las aproximaciones terapéuticas con mayor interés en investigación para el tratamiento de infecciones bacterianas de cepas multi- y panresistentes es la combinación de agentes antimicrobianos con péptidos inhibidores de factores de virulencia del patógeno (143). En este escenario, como hemos descrito anteriormente, el desarrollo de una librería de hexapéptidos cíclicos para la inhibición de la OmpA, permitió la obtención de un compuesto, el AOA-2, con resultados prometedores tanto *in vitro* como *in vivo*. Nuestro grupo demostró recientemente que este inhibidor era capaz de reducir la adherencia de BGN como *A. baumannii*, *P. aeruginosa* y *E. coli* a células epiteliales del huésped, y con ello permitía aumentar la viabilidad de estas células durante una infección por estos patógenos. Además, en un modelo experimental de sepsis peritoneal por *A. baumannii*, el tratamiento con este AOA-2 redujo la mortalidad de los ratones, traducándose en una disminución de la carga bacteriana tanto en los tejidos como en la sangre (147). Además, posteriormente también fue descrita la actividad sinérgica de este péptido en combinación con la colistina en cepas resistentes a colistina de *A. baumannii* (183), por lo que el AOA-2 resulta un compuesto con resultados experimentales prometedores, usado tanto en monoterapia como en combinación con antibióticos de último recurso como la colistina. En este escenario,

DISCUSIÓN GENERAL

existen otros estudios donde se demuestra la actividad de otros compuestos inhibidores de factores de virulencia (184). Por ejemplo, el compuesto M64, un inhibidor contra el factor de virulencia MvfR de *P. aeruginosa*, está en fase preclínica de desarrollo (185), o el compuesto 22, un manósido, contra el factor de virulencia FimK y FimH de *E. coli* uropatógena (186, 187). Estos resultados prometedores en fases preclínicas deben verse reafirmados en la fase más crítica del desarrollo, como es el ensayo clínico. No es infrecuente que compuestos con datos relevantes en fases previas fracasen en el ensayo clínico, como es el caso del compuesto KB001A contra el factor de virulencia PcrV de *P. aeruginosa*, que falló en la fase clínica II (188).

No obstante, a pesar de estos resultados positivos tanto *in vitro* como *in vivo*, era importante conocer y demostrar el mecanismo por el cual el AOA-2 inhibía a la OmpA. Para ello se llevaron a cabo experimentos de RMN, donde se pudo estudiar la interacción de este compuesto con la proteína diana. Así, estudios de RMN de difusión demostraron que la disminución de la intensidad de la señal debido a la difusión de la molécula era menor en presencia de la OmpA, es decir que la difusión de AOA-2 se reducía por la presencia de OmpA, sugiriendo que el tamaño de AOA-2 en presencia de OmpA era mayor que en ausencia de OmpA, lo que se traducía en que AOA-2 podría unirse a OmpA (Figura 1, artículo 1, capítulo I).

Otro contexto que queríamos estudiar era el posible efecto del AOA-2 sobre la respuesta inmune innata y adaptativa. Es conocido que algunos compuestos tienen efectos estimulantes sobre el sistema inmune del huésped, como es el caso de la lisofosfatidilcolina, que demostró causar una importante mejoría en modelos experimentales murinos de sepsis peritoneal y neumonía por *A. baumannii*, reduciendo la carga bacteriana en tejidos como el bazo y el pulmón, así como la bacteriemia (147). Por ello, se estudió la producción de diferentes citoquinas, proinflamatorias y antiinflamatorias, después del tratamiento con AOA-2 tanto en ratones sanos como en un modelo de neumonía no letal por la cepa CS01 de *A. baumannii*. La administración del AOA-2 en ratones sanos no produjo la respuesta del sistema inmune innato, puesto que no se detectaron niveles altos de las citoquinas estudiadas; TNF- α , IL-6, IL-1 β e IL-10 e. En el modelo de neumonía por la cepa CS01 de *A. baumannii*, solamente a 12 horas después de la infección, el tratamiento con AOA-2 producía un pico de IL-10 hasta alcanzar los 597 pg/mL, cinco veces mayor al grupo de ratones infectados sin tratamiento (Figura A1, datos adicionales, capítulo I). Siendo IL-10 la interleucina con la actividad antiinflamatoria más potente (191), también conocida como factor de

DISCUSIÓN GENERAL

inhibición de citoquinas, parece que la administración del péptido podía tener un efecto modulador sobre la producción de citocinas proinflamatorias en las primeras horas de la infección causada por *A. baumannii* en los pulmones, aunque este efecto sobre citoquinas proinflamatorias como el TNF- α no se observa a las 12 h, por lo que no podemos afirmar que el tratamiento con AOA-2 tenga un efecto sobre la respuesta innata inmune. No obstante, resultaría interesante estudiar esta respuesta en un modelo letal de neumonía, donde este efecto observado pudiera ser determinante en la eficacia terapéutica como compuesto modulador del sistema inmune.

Con respecto a la respuesta inmune adaptativa, se estudiaron los niveles de linfocitos B, CD19+, y linfocitos T, CD4+ y CD8+ a diferentes días: 1, 3, 7, 14 y 30 días. La respuesta adaptativa se establece entre el día 4 y 7 después de la infección (192), por lo que los resultados a partir del día 7 son los que nos pueden proporcionar una idea acerca de si el tratamiento con AOA-2 afecta a este nivel. Además, al ser un modelo de infección de neumonía no letal, es en este órgano donde se ven las diferencias más relevantes de las diferentes poblaciones dependiendo del grupo de tratamiento. Así pues, en el grupo de ratones infectados y no tratados, la población de linfocitos B CD19+ aumentaba de forma significativa a los 7 y 14 días, mientras que para los grupos de animales tratados con AOA-2, infectados y no infectados, esta población se mantenía en niveles inferiores a los infectados y no tratados. Esta mayor población de linfocitos B en los animales infectados sin tratar puede deberse a su propia función de originar células plasmáticas productoras de anticuerpos en la zona de infección, mientras que el grupo infectado con tratamiento es menor debido al posible efecto terapéutico del AOA-2. Un efecto similar aunque en menor grado ocurre en la población de linfocitos T CD8+, donde existe un mayor número de ellos a los 7 días en los animales infectados sin tratar que en aquellos que han sido tratados con AOA-2, probablemente por la misma hipótesis descrita anteriormente. Sin embargo, en la población de linfocitos T CD4+ no existen diferencias significativas; esto puede ser debido a que el modelo de infección, al no ser letal, no requiera de la acción de estas células T citotóxicas, ya que probablemente el papel de los demás grupos celulares sea suficiente para que el sistema inmune sea capaz de controlar la infección (Figura A2, datos adicionales, capítulo I).

En cuanto al ratio CD4+/CD8+, utilizado en pacientes infectados por el VIH para determinar su estado inmunológico, no podemos establecer ninguna relación concluyente en nuestro estudio (Figura A3, datos adicionales, capítulo I), debido a que en una infección bacteriana no letal no se depleciona la población de linfocitos CD4+,

DISCUSIÓN GENERAL

además de que se trata de un estudio experimental murino, y no un ensayo con pacientes humanos.

Por tanto, y en resumen, podríamos afirmar que el tratamiento con AOA-2 no modula como tal la respuesta inmune adaptativa, sino que su posible efecto terapéutico sobre la infección por *A. baumannii* esté traducándose en una menor representación de estas poblaciones de células inmunes.

Teniendo el AOA-2 de referencia como compuesto con actividad frente a BGN tanto *in vitro* como *in vivo*, el desarrollo de una librería de compuestos derivados de este péptido, con el fin de optimizar su actividad y mejorar la eficacia del tratamiento, es una aproximación ambiciosa que nos propusimos llevar a cabo, como en el caso de otras librerías de compuestos derivados con capacidad antibacteriana descritas en la literatura científica, por ejemplo la familia de las pirimidinas (193, 194) o de las tirocidinas (195, 196). Así pues, se obtuvo una librería de diez compuestos peptídicos derivados del AOA-2, con diferentes modificaciones en su estructura; potenciamiento de la solubilidad mediante adición de grupos NH₂, utilización de análogos de triptófano o arginina, reposicionamiento de la secuencia madre, y aquellos péptidos que mostraron un mayor *docking score* que el AOA-2 (Tabla 1, Figura 1, artículo 2, capítulo I). Así pues, antes de evaluar las actividades inhibitorias de los derivados sobre la adherencia del patógeno, es importante conocer si estos compuestos no tienen ningún efecto sobre las propias bacterias ni sobre las células del huésped. En este sentido, ninguno de estos compuestos mostró actividad antibacteriana. Además, mediante el ensayo MTT de viabilidad celular se demostró que estos derivados no presentan toxicidad sobre las células epiteliales A549 (Tabla 2, artículo 2, capítulo I).

En referencia a la OmpA, está demostrado que esta proteína está involucrada en la inducción de muerte celular después de su translocación hacia el núcleo de las células del huésped y en la mortalidad de ratones (64). Se ha demostrado recientemente, que el péptido AOA-2 fue capaz de reducir la adherencia bacteriana y prevenir la citotoxicidad causada por *A. baumannii* y *P. aeruginosa* sobre las células epiteliales A549 (147). También redujo dicha adherencia bacteriana y citotoxicidad causada por *E. coli*, pero de forma más leve, debido a la mayor virulencia de este patógeno sobre estas células, probablemente a causa de la presencia de toxinas (103). En este contexto, nuestro objetivo de optimizar la molécula AOA-2 radicaba en la consecución de un derivado que mejorase la capacidad inhibitoria que había demostrado previamente su molécula madre. Por ello, evaluamos la actividad inhibitoria de estos diez compuestos derivados

DISCUSIÓN GENERAL

sobre la OmpA de *A. baumannii*, *P. aeruginosa* y *E. coli*. Mediante un ensayo de adhesión bacteriana sobre células A549, estudiamos si el tratamiento de cada uno de estos péptidos a 250 µg/mL con la bacteria provocaba una disminución de dicha adherencia. En resumen, para *A. baumannii* los péptidos RW01, RW02, RW03, RW06 y RW08 mostraron reducción de la adherencia bacteriana. Para *P. aeruginosa*, todos los compuestos mostraron reducción de la adherencia bacteriana, mientras que para *E. coli* los péptidos RW01, RW02, RW03, RW06, RW07 y RW13 mostraron reducción en la adherencia. La diferencia de estos resultados podría ser debida la diferencia en la homología de OmpA entre los tres patógenos. Se sabe que la secuencia de OmpA de *A. baumannii* presenta 58% de homología con la secuencia de OmpA o su hómologa de *E. coli* y *P. aeruginosa* (197).

Con los resultados antes citados, decidimos elegir aquellos péptidos que mostraron capacidad de reducción de la adherencia para los tres patógenos, con el objetivo de cubrir el mayor espectro posible. Por esta razón, se eligieron los compuestos RW01, RW02, RW03 y RW06 como candidatos a péptidos optimizados. Posteriormente, realizamos el mismo ensayo de adherencia bacteriana pero a concentraciones decrecientes, desde 250 a 31,25 µg/mL, para comparar el efecto de reducción de la adherencia con respecto al AOA-2 a las mismas concentraciones; los compuestos RW01 y RW06 se eligieron como los péptidos que mostraron mejores resultados *in vitro*, ya que redujeron la adherencia bacteriana más que el AOA-2 para los tres patógenos (Figura 3, artículo 2, capítulo I). También, el tratamiento con estos dos compuestos demostró un aumento en la viabilidad celular de células del huésped A549 para *A. baumannii* y *P. aeruginosa* a las 24 h, siendo muy leve este aumento en *E. coli*, posiblemente debido a su mayor virulencia contra las células a causa de las toxinas que presenta este patógeno (Figura 4, artículo 2, capítulo I). En resumen, el RW01 y RW06 son los péptidos optimizados con mejor actividad *in vitro* mostrada frente a los diferentes patógenos. Estudios de eficacia terapéutica en modelos experimentales murinos de infección, como sepsis peritoneal y neumonía serían necesarios para confirmar los resultados prometedores *in vitro*. Además, no podemos descartar aquellos derivados que también mostraron actividad contra un solo patógeno, como en el caso de *P. aeruginosa*, para los que todos los péptidos presentaron actividad *in vitro*, con el fin de explorar futuras líneas de desarrollo de compuestos con actividad específica contra un patógeno, tanto en monoterapia como en combinación con antibióticos que puedan ver potenciada su actividad.

DISCUSIÓN GENERAL

Capítulo 2. Efecto de los antihelmínticos sobre la eficacia de la colistina frente a BGN.

El interés por la reutilización de medicamentos como una opción alternativa terapéutica en la lucha contra infecciones ha ido en aumento en los últimos años. Al tratarse de fármacos aprobados por la FDA de los Estados Unidos, sus características farmacológicas en ensayos preclínicos y clínicos se encuentran disponibles. Todas estas condiciones ya desarrolladas hacen que el tiempo y los costes económicos requeridos para la evaluación de estos medicamentos con otros fines terapéuticos, como el tratamiento de infecciones bacterianas, se reduzcan, siempre que se manejen dentro de los rangos farmacológicos ya estudiados previamente y, por tanto, seguros (198).

Los medicamentos antihelmínticos constituyen una gran familia de compuestos utilizados para el tratamiento de la helmintiasis. Más allá de su uso terapéutico contra parásitos, se están investigando como fármacos reposicionados en otras áreas como la oncología (199). También existen artículos en la literatura científica sobre la actividad de estos fármacos contra patógenos grampositivos y gramnegativos, así como para un uso antifúngico. Dentro de este amplio grupo de medicamentos, se encuentra una familia de compuestos, las salicilanilidas, cuyos miembros más utilizados incluyen a la niclosamida, usada en humanos (200) y la oxiclozanida, la rafoxanida y el closantel, de uso veterinario (201).

El mecanismo de acción de las salicilanilidas no se ha estudiado en profundidad, pero se cree que actúan como desacopladores de la fosforilación oxidativa, lo que altera la motilidad de los parásitos. Previamente a nuestro estudio, Rajamuthiah y coautores describieron la eficacia de la niclosamida y la oxiclozanida contra MRSA. Según su estudio, la niclosamida presentaba una actividad bacteriostática, mientras que la oxiclozanida presentó una acción antibacteriana, probablemente debido al daño en la membrana bacteriana que causa este fármaco (202). Además, estos dos fármacos, junto a otros miembros de la familia de las salicilanilidas, como la rafoxanida y el closantel, presentaron una mayor actividad bactericida contra *C. difficile* en ambas fases, logarítmica y estacionaria, en comparación con la vancomicina (203). Con estos estudios, decidimos estudiar el efecto de estos antihelmínticos contra bacilos gramnegativos. Al no presentar actividad antibacteriana por sí solos frente a estos patógenos, pensamos en una combinación con un antibiótico como la colistina, cuyo

DISCUSIÓN GENERAL

mecanismo de acción tiene como diana la membrana bacteriana, siendo esta estructura una posible diana de la niclosamida y la oxiclozanida.

Con respecto a la niclosamida, nuestro estudio demostró que la combinación de este fármaco con colistina potenciaba la actividad del antibiótico contra cepas sensibles y especialmente contra cepas resistentes a colistina de *A. baumannii* y *K. pneumoniae* a las 24 h (Figura 1, artículo 3, capítulo II). El antagonismo entre ambos fármacos observados en las primeras horas se puede relacionar con resultados similares de efecto antagónico de la colistina en combinación con otros fármacos (204, 205), un efecto que se solventó mediante una nueva adición de niclosamida a las 4 h (Figura 3, artículo 3, capítulo II).

A pesar de que los BGN pueden tener resistencia intrínseca a la niclosamida debido a sus características funcionales y estructurales (206), nuestro estudio demostró que este antihelmíntico aumentaba la carga superficial negativa de las cepas sensibles y resistentes de ambos patógenos. Algo interesante radicaba en que este efecto era mayor en las cepas resistentes a colistina que en las sensibles, ya estas cepas mostraban menos cargas superficiales negativas que las cepas sensibles (Figura 4, artículo 3, capítulo II). Un estudio en este sentido y que está en relación a lo que pudimos observar demostró que análogos de salicilanilida provocaban la despolarización de la membrana bacteriana de *C. difficile* mediante la disipación del potencial de membrana, inhibiendo su crecimiento (207). En resumen, la sinergia entre niclosamida y colistina se hace más evidente en cepas resistentes al antibiótico que en las cepas sensibles.

Con estos resultados, pensamos que la oxiclozanida, un derivado de la niclosamida, podría mejorar el efecto *in vitro* mostrado por la niclosamida, debido a que este derivado mostraba un efecto bactericida en grampositivos, mientras que la niclosamida mostraba un efecto bacteriostático. La disrupción de la membrana bacteriana se trata de una estrategia bien conocida para la sensibilización de bacterias gramnegativas, aunque esta aproximación no ha producido aún una opción terapéutica viable en la práctica clínica (208), por lo que la oxiclozanida, que presenta un papel disruptivo sobre la membrana (202), podría ser un candidato en esta estrategia terapéutica, en combinación con la colistina. A diferencia del estudio anterior de la niclosamida, en este estudio decidimos incluir un tercer patógeno gramnegativo de relevancia clínica como es *P. aeruginosa*. Pudimos demostrar que la oxiclozanida potenciaba el efecto de la colistina en *A. baumannii*, *K. pneumoniae* y *P. aeruginosa* (Tabla 3, artículo 4, capítulo II). Además, al igual que para la niclosamida, este efecto sinérgico era más pronunciado en

DISCUSIÓN GENERAL

las cepas resistentes al antibiótico, algo que refuerza una futura o posible aplicación clínica de estos antihelmínticos. Además, quisimos estudiar el mecanismo de acción que tenía la oxiclozanida sobre la bacteria. En primer lugar, quisimos saber si el efecto de la oxiclozanida producía una modificación en el perfil de las proteínas de membrana externa, donde existen varios factores de virulencia, pero no se observó ningún cambio en ninguna de las cepas bacterianas estudiadas (Figura 1, artículo 4, capítulo II). Posteriormente nos centramos en estudiar si la oxiclozanida provocaba un cambio estructural o morfológico en la membrana bacteriana. Para ello, se utilizó la microscopía electrónica de transmisión (TEM), con el fin de visualizar las diferentes cepas de *A. baumannii*, *P. aeruginosa* y *K. pneumoniae* tras el tratamiento durante 24 h con oxiclozanida (Figura 3, artículo 4, capítulo II); de esta forma pudimos constatar la acción disruptiva causada por este fármaco. Para respaldar esta observación con datos cuantitativos, medimos la permeabilización de la membrana por fluorescencia, (Figura 2, artículo 4, capítulo II); los resultados que obtuvimos nos confirmaron la idea obtenida por TEM. Curiosamente, los valores más altos de permeabilización de la membrana se obtuvieron en las cepas resistentes a colistina, hecho que guardaba relación con los datos obtenidos en las curvas de tiempo-muerte. Estas observaciones también se confirmaron cualitativamente mediante microscopía de fluorescencia (Figura 2, artículo 4, Capítulo II). Bajo estos resultados experimentales, sugerimos que la acción disruptiva de la oxiclozanida en la membrana bacteriana potencia el efecto de la colistina, viéndose este efecto más acusado en las cepas resistentes a colistina. Sería interesante la posibilidad de probar otros antibióticos, que actúan sobre la pared bacteriana, combinados con oxiclozanida en cepas gramnegativas para estudiar si este efecto disruptor de la membrana potencia su efecto, y abrir de esta forma el espectro de acción de este fármaco reposicionado contra cepas multirresistentes.

En definitiva, y como resumen de este capítulo, podemos resaltar con nuestros estudios y los que muestran otros autores, la evidencia científica de que la familia de los antihelmínticos, más concretamente las salicinalidas, es un grupo de fármacos con potencial acción sobre las bacterias, ya sea en monoterapia para grampositivos, o como adyuvante en combinación con antibióticos como la colistina, en el caso de los gramnegativos. No obstante, es necesario profundizar más, y realizar experimentos *in vivo* de estos fármacos, como modelos experimentales murinos de infección, donde poder estudiar la eficacia terapéutica de estos compuestos.

DISCUSIÓN GENERAL

Además, cabe resaltar como línea de investigación de gran interés actual el reposicionamiento de fármacos en diferentes campos de la biomedicina, no solo en el de las enfermedades infecciosas, sino en el cáncer, en enfermedades cardiovasculares, etcétera. Esta tendencia en auge se refleja en relación al número de artículos en el portal del NCBI PubMed, donde la búsqueda clasificada por años del tema “drug repurposing” se ha visto en claro aumento desde 2012, hasta multiplicarse por seis en el año 2018.

VII. CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

Capítulo I.

1. El péptido AOA-2 se une selectivamente con la proteína de membrana externa OmpA.
2. La eficacia terapéutica del péptido AOA-2 sobre la infección por los BGN observada *in vivo* no se debe a un efecto destacable sobre la respuesta inmune innata, aunque se observa una mayor producción de la citocina anti-inflamatoria IL-10.
3. El tratamiento con el péptido AOA-2 no modula como tal la respuesta inmune adaptativa, sino que su posible efecto terapéutico sobre la infección por *A. baumannii* se traduce en una menor representación de las poblaciones de linfocitos B CD19+ y de linfocitos T CD8+.
4. Los derivados RW01 y RW06 de AOA-2 mejoran la actividad del péptido parental en la disminución de la adherencia de los BGN al huésped y la citotoxicidad generada.

Capítulo II.

5. La niclosamida tiene actividad sinérgica en combinación con colistina frente a cepas de referencia sensibles y cepas clínicas resistentes a colistina de *A. baumannii* y *K. pneumoniae*.
6. La niclosamida produce una alteración sobre la carga eléctrica de la membrana, haciéndola más negativa, en cepas clínicas resistentes a colistina de *A. baumannii* y *K. pneumoniae*.
7. La oxiclozanida tiene actividad sinérgica en combinación con colistina frente a cepas de referencia y cepas clínicas resistentes de *A. baumannii*, *P. aeruginosa* y *K. pneumoniae*.
8. La oxiclozanida no afecta el perfil de las proteínas de la membrana externa de *A. baumannii*, *P. aeruginosa* y *E. coli* sensibles y resistentes a colistina.
9. La oxiclozanida produce un efecto disruptivo sobre la membrana bacteriana de cepas clínicas resistentes a colistina de *A. baumannii*, *P. aeruginosa* y *K. pneumoniae*.

VII. BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

1. Akova M. Epidemiology of antimicrobial resistance in bloodstream infections. *Virulence*. 2016;7:252-66.
2. World Health Organization. Antimicrobial Resistance: Global Report on Surveillance. WHOInt. 2014.
3. European Centre for Disease Prevention and Control. Annual Epidemiological Report. Antimicrobial Resistance and Healthcare Associated Infections. 2014.
4. European Centre for Disease Prevention and Control. Surveillance Report. Surveillance of antimicrobial resistance in Europe. 2016.
5. Klein E.Y., Tseng K.K., Pant S., Laxminarayan R. Tracking global trends in the effectiveness of antibiotic therapy using the drug resistance index. *BMJ Global Health*. 2019;4:e001315.
6. Meletis G. Carbapenem resistance: overview of the problem and future perspectives. *Therapeutic advances in infectious disease*. 2016;3:15-21.
7. Programa PIRASOA. Fundación Progreso y Salud. Línea IAVANTE. Consejería de Salud y familias. Junta de Andalucía. 2019. Recuperado de <http://pirasoa.iavante.es/>
8. CDC/NHSN Surveillance Definition of Healthcare-Associated Infection and Criteria for Specific Types of Infections. 2013.
9. Al-Tawfiq J.A., Tambyah P.A. Healthcare associated infections (HAI) perspectives. *Journal of Infection and Public Health*. 2014;7:339-44.
10. Hsu V. Prevention of Healthcare-Associated Infections. *American Family Physician*. 2014;90:377-82.
11. Chopra I., Schofield C., Everett M., O'Neill A., Miller K., Wilcox M., et al. Treatment of health-care-associated infections caused by Gram-negative bacteria: a consensus statement. *Lancet Infectious Diseases*. 2008;8:133-9.
12. Roberts R.R., Scott R.D., 2nd, Hota B., Kampe L.M., Abbasi F., Schabowski S., et al. Costs attributable to healthcare-acquired infection in hospitalized adults and a comparison of economic methods. *Medical Care*. 2010;48:1026-35.

BIBLIOGRAFÍA

13. Klevens R.M., Edwards J.R., Richards Jr C.L., Horan TC, Gaynes R.P., Pollock D.A., et al. Estimating health care-associated infections and deaths in US hospitals, 2002. Public Health Report. 2007;122:160-6.
14. Scott R.D. The direct medical costs of healthcare-associated infections in U.S. hospitals and the benefits of prevention. Division of Healthcare Quality Promotion, National Center for Preparedness, Detection, and Control of Infectious Diseases, Coordinating Center for Infectious Diseases, Centers for Disease Control and Prevention, March. 2009.
15. Gastmeier P., Schwab F., Sohr D., Behnke M., Geffers C. Reproducibility of the surveillance effect to decrease nosocomial infection rates. Infection Control Hospital Epidemiology. 2009;30:993-9.
16. Haley R.W., Culver D.H., White J.W., Morgan W.M., Emori T.G., Munn V.P., et al. The efficacy of infection surveillance and control programs in preventing nosocomial infections in US hospitals. American Journal of Epidemiology. 1985;121:182-205.
17. Sickbert-Bennett E.E., DiBiase L.M., Willis T.M., Wolak E.S., Weber D.J., Rutala W.A. Reduction of healthcare-associated infections by exceeding high compliance with hand hygiene practices. Emerging Infectious Diseases. 2016;22:1628-30.
18. Mehrad B., Clark N.M., Zhanel G.G., Lynch J.P. 3rd. Antimicrobial resistance in hospital-acquired gram-negative bacterial infections. Chest. 2015;147:1413-21.
19. Tacconelli E., Carrara E., Savoldi A., Harbarth S., Mendelson M., Monnet D.L., et al. Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. Lancet Infectious Diseases. 2018;18:318-27.
20. Lee C., Lee J.H., Park M., Park K.S., Bae I.K., Kim Y.B., et al. Biology of *Acinetobacter baumannii*: pathogenesis, antibiotic resistance mechanisms, and prospective treatment options. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology. 2017;13:7:55.
21. Lin M.F., Lin Y.Y., Yeh H.W., Lan C.Y. Role of the BaeSR two-component system in the regulation of *Acinetobacter baumannii* adeAB genes and its correlation with tigecycline susceptibility. BMC Microbiology. 2014;14:119.

BIBLIOGRAFÍA

22. Fournier P.E., Richet H. The epidemiology and control of *Acinetobacter baumannii* in health care facilities. *Clinical Infectious Diseases*. 2006;42:692-9.
23. Vincent J.L., Rello J., Marshall J., Silva E., Anzueto A., Martin C.D., et al. International study of the prevalence and outcomes of infection in intensive care units. *Journal of American Medical Association*. 2009;302:2323-9.
24. McConnell M.J., Actis L., Pachón J. *Acinetobacter baumannii*: human infections, factors contributing to pathogenesis and animal models. *FEMS Microbiology*. 2013;37:130-55.
25. Valero C., Garcia Palomo J.D., Matorras P., Fernández-Mazarrasa C., González C., Farinas M.C. *Acinetobacter* bacteraemia in a teaching hospital, 1989-1998. *European Journal of Internal Medicine*. 2001;12:425-9.
26. Cascio A., Conti A., Sinardi L., Iaria C., Angileri F.F., Stassi G., et al. Post-neurosurgical multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* meningitis successfully treated with intrathecal colistin. A new case and a systematic review of the literature. *International Journal of Infectious Diseases*. 2010;14:e572-9.
27. Bhagan-Bruno S., Lather N., Fergus I.V. *Acinetobacter* endocarditis presenting as a large right atrial mass: an atypical presentation. *Echocardiography*. 2010;27:E39-42.
28. Manchanda V., Sanchaita S., Singh N. Multidrug resistant *Acinetobacter*. *Journal of Global Infectious Diseases*. 2010;2:291-304.
29. Boucher H.W., Talbot G.H., Bradley J.S., Edwards J.E., Gilber, D., Rice, L. B., et al. Bad bugs, no drugs: no ESKAPE! An update from the Infectious Diseases Society of America. *Clinical Infectious Diseases*. 2009;48:1-12.
30. Kim Y.J., Kim S.I., Kim Y.R., Hong K.W., Wie S. H., Park Y.J., et al. Carbapenem resistant *Acinetobacter baumannii*: diversity of resistant mechanisms and risk factors for infection. *Epidemiology Infection*. 2012;140:137-45.
31. Touchon M., Cury J., Yoon E.J., Krizova L., Cerqueira G.C., Murphy C., et al. The genomic diversification of the whole *Acinetobacter* genus: origins, mechanisms, and consequences. *Genome Biology and Evolution*. 2014;6:2866-82.

BIBLIOGRAFÍA

32. Jeon J.H., Lee J.H., Lee J.J., Park K.S., Karim A.M., Lee C.R., et al. Structural basis for carbapenem-hydrolyzing mechanisms of carbapenemases conferring antibiotic resistance. *International Journal of Molecular Science*. 2015;16:9654-92.
33. Lin M.F., Lan C.Y. Antimicrobial resistance in *Acinetobacter baumannii*: From bench to bedside. *World Journal of Clinical Cases*. 2014;2:787-814.
34. Nemec A., Dolzani L., Brisse S., van den Broek P., Dijkshoorn L. Diversity of aminoglycoside-resistance genes and their association with class 1 integrons among strains of pan-European *Acinetobacter baumannii* clones. *Journal of Medical Microbiology*. 2014;53:1233-40.
35. Cai Y., Chai D., Wang R., Liang B., Bai N. Colistin resistance of *Acinetobacter baumannii*: clinical reports, mechanisms and antimicrobial strategies. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2012;67:1607-15.
36. Limansky A.S., Mussi M.A., Viale A.M. Loss of a 29-kilodalton outer membrane protein in *Acinetobacter baumannii* is associated with imipenem resistance. *Journal of Clinical Microbiology*. 2002;40:4776-8.
37. Siroy A., Molle V., Lemaitre-Guillier C., Vallenet D., Pestel-Caron M., Cozzone A.J., et al. Channel formation by CarO, the carbapenem resistance-associated outer membrane protein of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2005;49:4876-83.
38. Del Mar Tomas M., Beceiro A., Perez A., Velasco D., Moure R., Villanueva R., et al. Cloning and functional analysis of the gene encoding the 33- to 36-kilodalton outer membrane protein associated with carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2005;49:5172-5.
39. Gellatly S.L., Hancock R. *Pseudomonas aeruginosa*: new insights into pathogenesis and host defenses. *Pathogens and Disease*. 2013;67:159-73.
40. Pollack M. *Pseudomonas aeruginosa*. In: Principles and practices of infectious diseases. Mandell GI BJ, Dolin R (Eds). Churchill Livingstone, PA, USA, 2310-2335. 2000.

BIBLIOGRAFÍA

41. El Zowalaty M.E., Al Thani A.A., Webster T.J., El Zowalaty A.E., Schweizer H.P., Nasrallah G.K., et al. *Pseudomonas aeruginosa*: arsenal of resistance mechanisms, decades of changing resistance profiles, and future antimicrobial therapies. *Future Microbiology*. 2015;10:1683-706.
42. El Solh A.A., Akinnusi M.E., Wiener-Kronish J.P., Lynch S.V., Pineda L.A., Szarpa K. Persistent infection with *Pseudomonas aeruginosa* in ventilator-associated pneumonia. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 2008;178:513-9.
43. Parkins M.D., Gregson D.B., Pitout J.D., Ross T., Laupland K.B. Population-based study of the epidemiology and the risk factors for *Pseudomonas aeruginosa* bloodstream infection. *Infection*. 2010;38:25-32.
44. Juan C., Macia M.D., Gutierrez O., Vidal C., Perez J.L., Oliver A. Molecular mechanisms of beta-lactam resistance mediated by AmpC hyperproduction in *Pseudomonas aeruginosa* clinical strains. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2005;49:4733-8.
45. Islam S., Jalal S., Wretling B. Expression of the MexXY efflux pump in amikacin-resistant isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Clinical Microbiology and Infection*. 2004;10:877-83.
46. Morita Y., Tomida J., Kawamura Y. MexXY multidrug efflux system of *Pseudomonas aeruginosa*. *Frontiers in Microbiology*. 2012;3:408.
47. Mesaros N., Nordmann P., Plesiat P., Roussel-Delvallez M., Van Eldere J., Glupczynski Y., et al. *Pseudomonas aeruginosa*: resistance and therapeutic options at the turn of the new millennium. *Clinical Microbiology and Infection*. 2007;13:560-78.
48. Kohler T., Michea-Hamzehpour M., Epp S.F., Pechere J.C. Carbapenem activities against *Pseudomonas aeruginosa*: respective contributions of OprD and efflux systems. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1999;43:424-7.
49. Olaitan A.O., Morand S., Rolain J.M. Mechanisms of polymyxin resistance: acquired and intrinsic resistance in bacteria. *Frontiers in Microbiology*. 2014;5:643.

BIBLIOGRAFÍA

50. Jacques M. *Escherichia coli* virulence factors. Veterinary Immunology and Immunopathology. 2013;152:2-12.
51. Li B., Zhao Y., Liu C., Chen Z., Zhou D. Molecular pathogenesis of *Klebsiella pneumoniae*. Future Microbiology. 2014;9:1071-81.
52. Sociedad Española de Medicina Preventiva, Salud Pública e Higiene. Estudio de Prevalencia de las Infecciones Nosocomiales en España. Informe Global España. 2017.
53. Centers for Disease Control and Prevention. Office of Infectious Disease Antibiotic resistance threats in the United States. 2013.
54. Peralta G., Lamelo M., Alvarez-Garcia P., Velasco M., Delgado A., Horcajada J.P., et al. Impact of empirical treatment in extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. bacteremia. A multicentric cohort study. BMC Infectious Diseases. 2012;12:245.
55. Van Duin D., Doi Y. The global epidemiology of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. Virulence. 2017;4:460-9.
56. Ruppé E., Woerther P.L., Barbier F. Mechanisms of antimicrobial resistance in Gram-negative bacilli. Annals of Intensive Care. 2015;5:61.
57. Pitout J.D., Nordmann P., Poirel L. Carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*, a key pathogen set for global nosocomial dominance. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 2015;59:5873-84.
58. Liu Y.Y., Wang Y., Walsh T.R., Yi L.X., Zhang R., Spencer J., et al. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. Lancet Infectious Diseases. 2016;16:161-8.
59. Beceiro A., Del Mar Tomas M., Bou G. Antimicrobial resistance and virulence: a successful or deleterious association in the bacterial world? Clinical Microbiology Reviews. 2013;26:185-230.
60. Fairman J.W., Noinaj N., Buchanan S.K. The structural biology of beta-barrel membrane proteins: a summary of recent reports. Current Opinion in Structural Biology. 2011;21:523-31.

BIBLIOGRAFÍA

61. Rollauer S.E., Soorashjani M.A., Noinaj N., Buchanan S.K. Outer membrane protein biogenesis in Gram-negative bacteria. *Philosophical transactions of the Royal Society of London Series B, Biological Sciences*. 2015;370.
62. Smith S.G., Mahon V., Lambert M.A., Fagan R.P. A molecular Swiss army knife: OmpA structure, function and expression. *FEMS Microbiology Letters*. 2007;273:1-11.
63. Gaddy J.A., Tomaras A.P., Actis L.A. The *Acinetobacter baumannii* 19606 OmpA protein plays a role in biofilm formation on abiotic surfaces and in the interaction of this pathogen with eukaryotic cells. *Infection and Immunity*. 2009;77:3150-60.
64. Choi C.H., Hyun S.H., Lee J.Y., Lee J.S., Lee Y.S., Kim S.A., et al. *Acinetobacter baumannii* outer membrane protein A targets the nucleus and induces cytotoxicity. *Cellular Microbiology*. 2008;10:309-19.
65. McConnell M.J., Pachon J. Expression, purification, and refolding of biologically active *Acinetobacter baumannii* OmpA from *Escherichia coli* inclusion bodies. *Protein Expression and Purification*. 2011;77:98-103.
66. Smani Y., Fàbrega A., Roca I., Sánchez-Encinales V., Vila J., Pachón J. Role of OmpA in the multidrug resistance phenotype of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2014;58:1806-8.
67. Smani Y., López-Rojas R., Fàbrega A., Roca I., Vila J., Pachón J. Loss of OmpA affects the fitness and the virulence of *Acinetobacter baumannii*. 52nd Interscience Conference of Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 9-12 September 2012.
68. Smani Y., Dominguez-Herrera J., Pachón J. Association of the outer membrane protein Omp33 with fitness and virulence of *Acinetobacter baumannii*. *The Journal of Infectious Diseases*. 2013;208:1561-70.
69. Fernández-Cuenca F., Smani Y., Gómez-Sánchez M.C., Docobo-Pérez F., Caballero-Moyano F.J., Dominguez-Herrera J., et al. Attenuated virulence of a slow-growing pandrug-resistant *Acinetobacter baumannii* is associated with decreased expression of genes encoding the porins CarO and OprD-like. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 2011;38:548-9.

BIBLIOGRAFÍA

70. Fito-Boncompte L., Chapalain A., Bouffartigues E., Chaker H., Lesouhaitier O., Gicquel G., et al. Full virulence of *Pseudomonas aeruginosa* requires OprF. *Infection and Immunity*. 2011;79:1176-86.
71. Confer A.W., Ayalew S. The OmpA family of proteins: roles in bacterial pathogenesis and immunity. *Veterinary Microbiology*. 2013;163:207-22.
72. Phan G., Picard M., Broutin I. Focus on the Outer Membrane Factor OprM, the forgotten player from efflux pumps assemblies. *Antibiotics*. 2015;4:544-66.
73. Lister P.D., Wolter D.J., Hanson N.D. Antibacterial-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: clinical impact and complex regulation of chromosomally encoded resistance mechanisms. *Clinical Microbiology Reviews*. 2009;22:582-610.
74. Li H., Luo Y.F., Williams B.J., Blackwell T.S., Xie C.M. Structure and function of OprD protein in *Pseudomonas aeruginosa*: from antibiotic resistance to novel therapies. *International Journal of Medical Microbiology*. 2012;302:63-8.
75. Meier C., Oelschlaeger T.A., Merkert H., Korhonen T.K., Hacker J. Ability of *Escherichia coli* isolates that cause meningitis in newborns to invade epithelial and endothelial cells. *Infection and Immunity*. 1996;64:2391-9.
76. Prasadarao N.V., Wass C.A., Weiser J.N., Stins M.F., Huang S.H., Kim K.S. Outer membrane protein A of *Escherichia coli* contributes to invasion of brain microvascular endothelial cells. *Infection and Immunity*. 1996;64:146-53.
77. Wu H.H., Yang Y.Y., Hsieh W.S., Lee C.H., Leu S.J., Chen M.R. OmpA is the critical component for *Escherichia coli* invasion-induced astrocyte activation. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*. 2009;68:677-90.
78. Krishnan S., Prasadarao N.V. Outer membrane protein A and OprF: versatile roles in Gram-negative bacterial infections. *The FEBS Journal*. 2012;279:919-31.
79. Nicholson T.F., Watts K.M., Hunstad D.A. OmpA of uropathogenic *Escherichia coli* promotes postinvasion pathogenesis of cystitis. *Infection and Immunity*. 2009;77:5245-51.
80. Torres A.G., Jeter C., Langley W., Matthysse A.G. Differential binding of *Escherichia coli* O157:H7 to alfalfa, human epithelial cells, and plastic is mediated by a

BIBLIOGRAFÍA

variety of surface structures. *Applied and Environmental Microbiology*. 2005;71:8008-15.

81. Lee J.C., Koerten H., van den Broek P., Beekhuizen H., Wolterbeek R., van den Barselaar M., et al. Adherence of *Acinetobacter baumannii* strains to human bronchial epithelial cells. *Research in Microbiology*. 2006;157:360-6.

82. Gohl O., Friedrich A., Hoppert M., Averhoff B. The thin pili of *Acinetobacter* sp. strain BD413 mediate adhesion to biotic and abiotic surfaces. *Applied and Environmental Microbiology*. 2006;72:1394-401.

83. Smani Y., McConnell M.J., Pachón J. Role of fibronectin in the adhesion of *Acinetobacter baumannii* to host cells. *PloS One*. 2012;7:e33073.

84. Roger P., Puchelle E., Bajolet-Laudinat O., Tournier J.M., Debordeaux C., Plotkowski M.C., et al. Fibronectin and alpha5beta1 integrin mediate binding of *Pseudomonas aeruginosa* to repairing airway epithelium. *The European Respiratory Journal*. 1999;13:1301-9.

85. Smani Y., Docobo-Pérez F., López-Rojas R., Domínguez-Herrera J., Ibáñez-Martínez J., Pachón J. Platelet-activating factor receptor initiates contact of *Acinetobacter baumannii* expressing phosphorylcholine with host cells. *The Journal of Biological Chemistry*. 2012;287:26901-10.

86. Flemming H.C., Wingender J. The biofilm matrix. *Nature Reviews Microbiology*. 2010;8:623-33.

87. Rao R.S., Karthika R.U., Singh S.P., Shashikala P., Kanungo R., Jayachandran S., et al. Correlation between biofilm production and multiple drug resistance in imipenem resistant clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Indian Journal of Medical Microbiology*. 2008;26:333-7.

88. Franklin M.J., Chang C., Akiyama T., Bothner B. New Technologies for Studying Biofilms. *Microbiology Spectrum*. 2015:3.

89. Villegas M.V., Hartstein A.I. *Acinetobacter* outbreaks, 1977-2000. *Infection Control and Hospital Epidemiology*. 2003;24:284-95.

BIBLIOGRAFÍA

90. Lee H.W., Koh Y.M., Kim J., Lee J.C., Lee Y.C., Seol S.Y., et al. Capacity of multidrug-resistant clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* to form biofilm and adhere to epithelial cell surfaces. *Clinical microbiology and Infection*. 2008;14:49-54.
91. Stanley N.R., Lazazzera B.A. Environmental signals and regulatory pathways that influence biofilm formation. *Molecular Microbiology*. 2004;52:917-24.
92. Tomaras A.P., Dorsey C.W., Edelmann R.E., Actis L.A. Attachment to and biofilm formation on abiotic surfaces by *Acinetobacter baumannii*: involvement of a novel chaperone-usher pili assembly system. *Microbiology*. 2003;149:3473-84.
93. Vallet I., Diggle S.P., Stacey R.E., Camara M., Ventre I., Lory S., et al. Biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa*: fimbrial cup gene clusters are controlled by the transcriptional regulator MvaT. *Journal of Bacteriology*. 2004;186:2880-90.
94. Jackson D.W., Suzuki K., Oakford L., Simecka J.W., Hart M.E., Romeo T. Biofilm formation and dispersal under the influence of the global regulator CsrA of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*. 2002;184:290-301.
95. Jarrell K.F., McBride M.J. The surprisingly diverse ways that prokaryotes move. *Nature Reviews Microbiology*. 2008;6:466-76.
96. Kearns D.B. A field guide to bacterial swarming motility. *Nature Reviews Microbiology*. 2010;8:634-44.
97. Skerker J.M., Berg H.C. Direct observation of extension and retraction of type IV pili. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2001;98:6901-4.
98. Hahn H.P. The type-4 pilus is the major virulence-associated adhesin of *Pseudomonas aeruginosa*-a review. *Gene*. 1997;192:99-108.
99. Doyle T.B., Hawkins A.C., McCarter L.L. The complex flagellar torque generator of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*. 2004;186:6341-50.
100. Clemmer K.M., Bonomo R.A., Rather P.N. Genetic analysis of surface motility in *Acinetobacter baumannii*. *Microbiology*. 2011;157:2534-44.

BIBLIOGRAFÍA

101. Swiecicki J.M., Sliusarenko O., Weibel D.B. From swimming to swarming: *Escherichia coli* cell motility in two-dimensions. Integrative Biology: quantitative biosciences from nano to macro. 2013;5:1490-4.
102. Carabarin-Lima A., León-Izurieta L., Rocha-Gracia Rdel C., Castañeda-Lucio M., Torres C., Gutiérrez-Cazarez Z. First evidence of polar flagella in *Klebsiella pneumoniae* isolated from a patient with neonatal sepsis. Journal of Medical Microbiology. 2016;65:729-37.
103. Raetz C.R., Whitfield C. Lipopolysaccharide endotoxins. Annual Review of Biochemistry. 2002;71:635-700.
104. Garcia A., Salgado F., Solar H., Gonzalez C.L., Zemelman R., Onate A. Some immunological properties of lipopolysaccharide from *Acinetobacter baumannii*. Journal of Medical Microbiology. 1999;48:479-83.
105. Knapp S., Wieland C.W., Florquin S., Pantophlet R., Dijkshoorn L., Tshimbalanga N., et al. Differential roles of CD14 and toll-like receptors 4 and 2 in murine *Acinetobacter pneumonia*. American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine. 2006;173:122-9.
106. Adams M.D., Nickel G.C., Bajaksouzian S., Lavender H., Murthy A.R., Jacobs M.R., et al. Resistance to colistin in *Acinetobacter baumannii* associated with mutations in the PmrAB two-component system. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 2009;53:3628-34.
107. López-Rojas R., Domínguez-Herrera J., McConnell M.J., Docobo-Pérez F., Smani Y., Fernández-Reyes M., et al. Impaired virulence and in vivo fitness of colistin-resistant *Acinetobacter baumannii*. The Journal of Infectious Diseases. 2011;203:545-8.
108. Garcia-Quintanilla M., Carretero-Ledesma M., Moreno-Martínez P., Martín-Peña R., Pachón J., McConnell M.J. Lipopolysaccharide loss produces partial colistin dependence and collateral sensitivity to azithromycin, rifampicin and vancomycin in *Acinetobacter baumannii*. International Journal of Antimicrobial Agents. 2015;46:696-702.
109. Schwechheimer C., Kuehn M.J. Outer-membrane vesicles from Gram-negative bacteria: biogenesis and functions. Nature Reviews Microbiology. 2015;13:605-19.

BIBLIOGRAFÍA

110. Kwon S.O., Gho Y.S., Lee J.C., Kim S.I. Proteome analysis of outer membrane vesicles from a clinical *Acinetobacter baumannii* isolate. FEMS Microbiology Letters. 2009;297:150-6.
111. Rumbo C., Fernández-Moreira E., Merino M., Poza M., Mendez J.A., Soares N.C., et al. Horizontal transfer of the OXA-24 carbapenemase gene via outer membrane vesicles: a new mechanism of dissemination of carbapenem resistance genes in *Acinetobacter baumannii*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 2011;55:3084-90.
112. Holden V.I., Bachman M.A. Diverging roles of bacterial siderophores during infection. Metallomics: integrated biometal science. 2015;7:986-95.
113. Ferreira D., Seca A.M., Pinto D., Silva A.M. Targeting human pathogenic bacteria by siderophores: A proteomics review. Journal of Proteomics. 2016;145:153-66.
114. Whitehead N.A., Barnard A.M., Slater H., Simpson N.J., Salmond G.P. Quorum-sensing in Gram-negative bacteria. FEMS Microbiology Reviews. 2001;25:365-404.
115. Castillo-Juárez I., Maeda T., Mandujano-Tinoco E.A., Tomás M., Pérez-Eretza B., García-Contreras S.J., et al. Role of quorum sensing in bacterial infections. World Journal of Clinical Cases. 2015;3:575-98.
116. Camilli A., Bassler B.L. Bacterial small-molecule signaling pathways. Science. 2006;311:1113-6.
117. Zhang W., Li C. Exploiting quorum sensing interfering strategies in gram-negative bacteria for the enhancement of environmental applications. Frontiers in Microbiology. 2015;6:1535.
118. Rumbaugh K.P., Griswold J.A., Iglewski B.H., Hamood A.N. Contribution of quorum sensing to the virulence of *Pseudomonas aeruginosa* in burn wound infections. Infection and Immunity. 1999;67:5854-62.
119. Xu G.M. Relationships between the Regulatory Systems of Quorum Sensing and Multidrug Resistance. Frontiers in Microbiology. 2016;7:958.
120. Pulcini C., Bush K., Craig W.A., Frimodt-Moller N., Grayson M.L., Mouton J.W., et al. Forgotten antibiotics: an inventory in Europe, the United States, Canada, and Australia. Clinical Infectious Diseases. 2012;54:268-74.

BIBLIOGRAFÍA

121. Cassir N., Rolain J.M., Brouqui P. A new strategy to fight antimicrobial resistance: the revival of old antibiotics. *Frontiers in Microbiology*. 2014;5:551.
122. Falagas M.E., Kasiakou S.K. Colistin: the revival of polymyxins for the management of multidrug-resistant gram-negative bacterial infections. *Clinical Infectious Diseases*. 2005;40:1333-41.
123. Molina J., Cordero E., Pachon J. New information about the polymyxin/colistin class of antibiotics. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*. 2009;10:2811-28.
124. Koch-Weser J., Sidel V.W., Federman E.B., Kanarek P., Finer D.C., Eaton A.E. Adverse effects of sodium colistimethate. Manifestations and specific reaction rates during 317 courses of therapy. *Annals of Internal Medicine*. 1970;72:857-68.
125. Falagas M.E., Kasiakou S.K. Toxicity of polymyxins: a systematic review of the evidence from old and recent studies. *Critical Care*. 2006;10:R27.
126. Nation R.L., Li J. Colistin in the 21st century. *Current Opinion in Infectious Diseases*. 2009;22:535-43.
127. Yahav D., Farbman L., Leibovici L., Paul M. Colistin: new lessons on an old antibiotic. *Clinical Microbiology and Infection*. 2012;18:18-29.
128. Sabuda D.M., Laupland K., Pitout J., Dalton B., Rabin H., Louie T., et al. Utilization of colistin for treatment of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *The Canadian Journal of Infectious Diseases & Medical Microbiology*. 2008;19:413-8.
129. Zhang L., Dhillon P., Yan H., Farmer S., Hancock R.E. Interactions of bacterial cationic peptide antibiotics with outer and cytoplasmic membranes of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2000;44:3317-21.
130. Peterson A.A., Hancock R.E., McGroarty E.J. Binding of polycationic antibiotics and polyamines to lipopolysaccharides of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*. 1985;164:1256-61.
131. European Centre for Disease Prevention and Control. Carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in healthcare settings. Stockholm. 2016.

BIBLIOGRAFÍA

132. Bogdanovich T., Adams-Haduch J.M., Tian G.B., Nguyen M.H., Kwak E.J., Muto C.A., et al. Colistin-resistant, *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC)-producing *Klebsiella pneumoniae* belonging to the international epidemic clone ST258. *Clinical Infectious Diseases*. 2011;53:373-6.
133. Olaitan A.O., Morand S., Rolain J.M. Emergence of colistin-resistant bacteria in humans without colistin usage: a new worry and cause for vigilance. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 2016;47:1-3.
134. Brennan E., Martins M., McCusker M.P., Wang J., Alves B.M., Hurley D., et al. Multidrug-Resistant *Escherichia coli* in Bovine Animals, Europe. *Emerging Infectious Diseases*. 2016;22:1650-2.
135. Sonnevend A., Ghazawi A., Alqahtani M., Shibl A., Jamal W., Hashmeh R., et al. Plasmid-mediated colistin resistance in *Escherichia coli* from the Arabian Peninsula. *International Journal of Infectious Diseases*. 2016;50:85-90.
136. Xavier B.B., Lammens C., Ruhel R., Kumar-Singh S., Butaye P., Goossens H., et al. Identification of a novel plasmid-mediated colistin-resistance gene, mcr-2, in *Escherichia coli*, Belgium, June 2016. *Eurosurveillance*. 2016;21.
137. Goodlet K.J., Nicolau D.P., Nailor M.D. Ceftolozane/tazobactam and ceftazidime/avibactam for the treatment of complicated intra-abdominal infections. *Therapeutics and Clinical Risk Management*. 2016;12:1811-26.
138. Livermore D.M., Mushtaq S., Meunier D., Hopkins K.L., Hill R., Adkin R., et al. Activity of ceftolozane/tazobactam against surveillance and 'problem' Enterobacteriaceae, *Pseudomonas aeruginosa* and non-fermenters from the British Isles. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2017;72: 2278-89.
139. Calbo E., Salavert M. Utilización de ceftazidima/avibactam en el hospital: ¿cuándo?, ¿dónde?, ¿cómo? *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 2017;35:42-7.
140. Sader H.S., Castanheira M., Shortridge D., Mendes R.E., Flamm R.K. Antimicrobial activity of ceftazidime-avibactam tested against multidrug-resistant Enterobacteriaceae and *Pseudomonas aeruginosa* Isolates from U.S. Medical Centers, 2013 to 2016. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2017;61:e01045-17.

BIBLIOGRAFÍA

141. Rasko D.A., Sperandio V. Anti-virulence strategies to combat bacteria-mediated disease. *Nature Reviews Drug Discovery*. 2010;9:117-28.
142. Rasko, D. A., Moreira C.G., Li de R., Reading N.C., Ritchie J.M., Waldor M.K., et al. Targeting QseC signaling and virulence for antibiotic development. *Science*. 2008;321:1078-80.
143. Cegelski L., Marshall G.R., Eldridge G.R., Hultgren S.J. The biology and future prospects of antivirulence therapies. *Nature Reviews Microbiology*. 2008;6:17-27.
144. Opal S.M. Non-antibiotic treatments for bacterial diseases in an era of progressive antibiotic resistance. *Critical Care*. 2016;20:397.
145. Brackman G., Coenye T. Quorum sensing inhibitors as anti-biofilm agents. *Current Pharmaceutical Design*. 2015;21:5-11.
146. Berg, V., Sellstedt M., Hedenström M., Pinkner J.S., Hultgren S.J., Almqvist F. Design, synthesis and evaluation of peptidomimetics based on substituted bicyclic 2-pyridones-targeting virulence of uropathogenic *E. coli*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 2006;14,7563-81.
147. Vila-Farrés X., Parra-Millán R., Sánchez-Encinales V., Varese M., Ayerbe-Algaba R., Bayó N., et al. Combating virulence of Gram-negative bacilli by OmpA inhibition. *Scientific Reports*. 2017;7:14683.
148. Ruiz J., Castro I., Calabuig E., Salavert M. Non-antibiotic treatment for infectious diseases. *Revista Española de Quimioterapia*. 2017;30:66-71.
149. Wright A., Hawkins C.H., Anggard E.E., Harper D.R. A controlled clinical trial of a therapeutic bacteriophage preparation in chronic otitis due to antibiotic resistant *Pseudomonas aeruginosa*; a preliminary report of efficacy. *Clinical Otolaryngology*. 2009;34:349-57.
150. Wittebole X., De Roock S., Opal S. A historical overview of bacteriophage therapy as an alternative to antibiotics for the treatment of bacterial pathogens. *Virulence*. 2014;5:226-35.

BIBLIOGRAFÍA

151. Czaplewski L., Bax R., Clokie M., Dawson M., Fairhead H., Fischetti V.A., et al. Alternatives to antibiotics-a pipeline portfolio review. *The Lancet Infectious Diseases*. 2016;16:239-51.
152. Perrin-Cocon L., Agaue S., Coutant F., Saint-Mezard P., Guironnet-Paquet A., Nicolas J.F., et al. Lysophosphatidylcholine is a natural adjuvant that initiates cellular immune responses. *Vaccine*. 2006;24:1254-63.
153. Yan J.J., Jung J.S., Lee J.E., Lee J., Huh S.O., Kim H.S., et al. Therapeutic effects of lysophosphatidylcholine in experimental sepsis. *Nature Medicine*. 2004;10:161-7.
154. Smani Y., Domínguez-Herrera J., Ibáñez-Martínez J., Pachón J. Therapeutic efficacy of lysophosphatidylcholine in severe infections caused by *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2015;59:3920-4.
155. Parra-Millán R., Jiménez-Mejías M.E., Sánchez-Encinales V., Ayerbe-Algaba R., Gutiérrez-Valencia A., Pachón-Ibáñez M.E., et al. Efficacy of lysophosphatidylcholine in combination with antimicrobial agents against *Acinetobacter baumannii* in experimental murine peritoneal sepsis and pneumonia models. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2016;60:4464-70.
156. Conlon J.M., Sonnevend A. Antimicrobial peptides in frog skin secretions. *Methods in Molecular Biology*. 2010;618:3-14.
157. Nijnik A., Hancock R. Host defence peptides: antimicrobial and immunomodulatory activity and potential applications for tackling antibiotic-resistant infections. *Emerging Health Threats Journal*. 2009;2:e1.
158. Routsias J.G., Karagounis P., Parvulesku G., Legakis N.J., Tsakris A. *In vitro* bactericidal activity of human beta-defensin 2 against nosocomial strains. *Peptides*. 2010;31:1654-60.
159. Feng Z., Jia X., Adams M.D., Ghosh S.K., Bonomo R.A., Weinberg A. Epithelial innate immune response to *Acinetobacter baumannii* challenge. *Infection and Immunity*. 2014;82:4458-65.
160. Feng X., Sambanthamoorthy K., Palys T., Parnavitana C. The human antimicrobial peptide LL-37 and its fragments possess both antimicrobial and

BIBLIOGRAFÍA

antibiofilm activities against multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. Peptides. 2013;49:131-7.

161. Gooyit M., Janda K.D. Reprofiled anthelmintics abate hypervirulent stationary-phase *Clostridium difficile*. Scientific Reports. 2016;6:33642.

162. Joffe L.S., Schneider R., Lopes W., Azvedo R., Staats C.C., Kmetzsch L., et al. The anti-helminthic compound mebendazole has multiple antifungal effects against *Cryptococcus neoformans*. Frontiers in Microbiology. 2017;8:535.

163. Yeo W.S., Arya R., Kim K.K., Jeong H., Cho K.H., Bae T. The FDA-approved anti-cancer drugs, streptozotocin and floxuridine, reduce the virulence of *Staphylococcus aureus*. Scientific Reports. 2018;8:2521.

164. Artini M., Cellini R., Tilota A., Barbato M., Koverech A., et al. Effect of betamethasone in combination with antibiotics on Gram positive and Gram negative bacteria. International Journal of Immunopathology and Pharmacology. 2014;27:675-82.

165. Andersson, J.A., Fitts E.C., Kirtley M.L., Ponnusamy D., Peniche A.G., Dann S.M., et al. New role for FDA-approved drugs in combating antibiotic-resistant bacteria. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 2016;60:3717-29.

166. Thangamani S., Mohammad H., Abushahba M.F.N., Hamed M.I., Sobreira T.J.P., Hedrick V.E., et al. Exploring simvastatin, an antihyperlipidemic drug, as a potential topical antibacterial agent. Scientific Reports. 2015;5:16407.

167. Gi M., Jeong J., Lee K., Lee K.M., Toyofuku M., Yong D.E., et al. A drug-repositioning screening identifies pentetic acid as a potential therapeutic agent for suppressing the elastase-mediated virulence of *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 2014;58:7205-14.

168. Chen W., Mook R.A. Jr., Premont R.T., Wang J. Niclosamide: Beyond an antihelminthic drug. Cellular Signaling. 2018;41:89-96.

169. Martin R.J. Modes of action of anthelmintic drugs. The Veterinary Journal. 1997;154:11-34.

BIBLIOGRAFÍA

170. Imperi F., Massai F., Ramachandran Pillai C., Longo F., Zennaro E., Rampioni G., et al. New life for an old drug: the anthelmintic drug niclosamide inhibits *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2013;57:996-1005.
171. Tharmalingam N., Port J., Castillo D., Mylonakis E. Repurposing the anthelmintic drug niclosamide to combat *Helicobacter pylori*. *Scientific Reports*. 2018;8:3701.
172. Gerits E., Defraigne V., Vandamme K., De Cremer K., De Brucker K., Thevissen K., et al. Repurposing toremifene for treatment of oral bacterial infections. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2017;61: e01846-16.
173. Antunes L.C.S., Imperi F., Minandri F., Visca P. *In vitro* and *in vivo* antimicrobial activities of gallium nitrate against multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2012;56:5961-70.
174. Rangel-Vega A., Bernstein L.R., Mandujano-Tinoco E.A., García-Contreras S.J., García-Contreras R. Drug repurposing as an alternative for the treatment of recalcitrant bacterial infections. *Frontiers in Microbiology*. 2015;6:282.
175. Artini M., Cellini R., Tilota A., Barbato M., Koverech A., et al. Effect of betamethasone in combination with antibiotics on Gram positive and Gram negative bacteria. *International Journal of Immunopathology and Pharmacology*. 2014;27:675-82.
176. Dutta N.K., Annadurai S., Mazumdar K., Dastidar S.G., Kristiansen J.E., Molnar J., et al. Potential management of resistant microbial infections with a novel non-antibiotic: the anti-inflammatory drug diclofenac sodium. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 2007;30:242-9.
177. Christiansen S.H., Murphy R.A., Juul-Madsen K., Fredborg M., Hvam M.L., Axelgaard E., et al. The immunomodulatory drug glatiramer acetate is also an effective antimicrobial agent that kills Gram-negative bacteria. *Scientific Reports*. 2017;7:15653.
178. Lieberman L.A., Higgins D.E. A small-molecule screen identifies the antipsychotic drug pimozide as an inhibitor of *Listeria monocytogenes* infection. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2009;53:756-64.

BIBLIOGRAFÍA

179. Andersson J.A., Sha J., Kirtley M.L., Reyes E., Fitts E.C., Dann S.M., et al. Combating multidrug-resistant pathogens with host-directed nonantibiotic therapeutics. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*. 2017;62: e01943-17.
180. Hennessy E., O’Callaghan J., Mooij M.J., Legendre C., Camacho-Vanegas O., Camacho S.C., et al. The impact of simvastatin on pulmonary effectors of *Pseudomonas aeruginosa* infection. *PloS One*. 2014;9:e102200.
181. Nouari W., Ysmail-Dahlouk L., Aribi M. Vitamin D3 enhances bactericidal activity of macrophage against *Pseudomonas aeruginosa*. *International Immunopharmacology*. 2015;30:94-101.
182. López-Rojas R., Jiménez-Mejías M.E., Lepe J.A., Pachón J. *Acinetobacter baumannii* resistant to colistin alters its antibiotic resistance profile: a case report from Spain. *The Journal of Infectious Diseases*. 2011;204:1147-8.
183. Parra-Millán R., Vila-Farrés X., Ayerbe-Algaba R., Varese M., Sánchez-Encinales V., Bayó N., et al. Synergistic activity of an OmpA inhibitor and colistin against colistin-resistant *Acinetobacter baumannii*: mechanistic analysis and in vivo efficacy. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2018;73:3405-12.
184. Dickey S.W., Cheung G.Y.C., Otto M. Different drugs for bad bugs: antivirulence strategies in the age of antibiotic resistance. *Nature Reviews Drug Discovery*. 2017;16:457-71.
185. Starkey M., Lepine F., Maura D., Bandyopadhyaya A., Lesic B., He J., et al. Identification of anti-virulence compounds that disrupt quorum-sensing regulated acute and persistent pathogenicity. *PLoS Pathogens*. 2014;10:e1004321.
186. Jarvis C., Han Z., Kalas V., Klein R., Pinkner J.S., Ford B., et al. Antivirulence isoquinolone mannosides: optimization of the biaryl aglycone for FimH lectin binding affinity and efficacy in the treatment of chronic UTI. *Chem Med Chem*. 2016;11:367-73.
187. Cusumano C.K., Pinkner J.S., Han Z., Greene S.E., Ford B.A., Crowley J.R., et al. Treatment and prevention of urinary tract infection with orally active FimH inhibitors. *Science Translational Medicine*. 2011;3:109-15.

BIBLIOGRAFÍA

188. Baer M., Sawa T., Flynn P., Luehrsen K., Martinez D., Wiener-Kronish J.P., et al. An engineered human antibody fab fragment specific for *Pseudomonas aeruginosa* PcrV antigen has potent antibacterial activity. *Infection and Immunity*. 2009;77:1083-90.
189. Morrill H.J., Pogue J.M., Kaye K.S., LaPlante K.L. Treatment Options for Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae Infections. *Open Forum Infectious Diseases*. 2015;2: ofv050.
190. Vila J., Pachon J. Therapeutic options for *Acinetobacter baumannii* infections: an update. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*. 2012;13:2319-36.
191. Saxena A., Khosraviani S., Noel S., Mohan D., Donner T., Hamad A.R. Interleukin-10 paradox: A potent immunoregulatory cytokine that has been difficult to harness for immunotherapy. *Cytokine*. 2015;74:27-34.
192. Janeway C.A., Travers P., Walport, M., Shlomchik M.J. *Immunobiology* (5th ed.). New York and London: Garland Science. 2001.
193. Shetty P., Praveen B.M., Raghavendra M., Manjunath K., Cheruku S. Synthesis and antimicrobial evaluation of novel 4-amino-6-(1,3,4-oxadiazolo/1,3,4-thiadiazolo)-pyrimidine derivatives. *Molecular Diversity*. 2016;20:391-8.
194. Marepu N., Yeturu S., Pal M. 1,2,3-Triazole fused with pyridine/pyrimidine as new template for antimicrobial agents: Regioselective synthesis and identification of potent N-heteroarenes. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 2018;28:3302-6.
195. Hu H., Xue J., Swarts B.M., Wang Q., Wu Q., Guo Z. Synthesis and antibacterial activities of N-glycosylated derivatives of tyrocidine A, a macrocyclic peptide antibiotic. *Journal of Medicinal Chemistry*. 2009;52:2052-9.
196. Nielubowicz G.R., Mobley H.L. Host-pathogen interactions in urinary tract infection. *Nature Reviews Urology*. 2010;7:430-41.
197. Gribun A., Nitzan Y., Pechatnikov I., HersHKovits G., Katcoff D.J. Molecular and structural characterization of the HMP-AB gene encoding a pore-forming protein from a clinical isolate of *Acinetobacter baumannii*. *Current Microbiology*. 2003;47:434-43.

BIBLIOGRAFÍA

198. Wang L.H., Xu M., Fu L.Q., Chen X.Y., Yang F. The antihelmintic niclosamide inhibits cancer stemness, extracellular matrix remodeling, and metastasis through dysregulation of the nuclear β -catenin/c-Myc axis in OSCC. *Scientific Reports*. 2018;8:12776.
199. Brown D. Antibiotic resistance breakers: can repurposed drugs fill the antibiotic discovery void? *Nature Reviews Drug Discovery*. 2015;14:821-32.
200. Chen W., Mook R.A. Jr., Premont R.T., Wang J. Niclosamide: Beyond an antihelminthic drug. *Cellular Signalling*. 2018;41:89-96.
201. Martin R.J. Modes of action of anthelmintic drugs. *The Veterinary Journal*. 1997;154:11-34.
202. Rajamuthiah R., Fuchs B.B., Conery A.L., Kim W., Jayamani E., Kwon B., et al. Repurposing salicylanilide anthelmintic drugs to combat drug resistant *Staphylococcus aureus*. *PLoS One*. 2015;10:e0124595.
203. Gooyit M., Janda K.D. Reprofiled anthelmintics abate hypervirulent stationary-phase *Clostridium difficile*. *Scientific Reports*. 2016;6:33642.
204. Hong J. H., Clancy C. J., Cheng S., Shields R. K., Chen L., Doi Y., et al. Characterization of porin expression in *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC)-producing *K. pneumoniae* identifies isolates most susceptible to the combination of colistin and carbapenems. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2013; 57:2147-53.
205. Safarika A., Galani I., Pistiki A., Giamarellos-Bourboulis E.J. Time-kill effect of levofloxacin on multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*: synergism with imipenem and colistin. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*. 2015;34:317-23.
205. Blair J.M., Webber M.A., Baylay A.J., Ogbolu D.O., Piddock L.J.V. Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Nature Reviews Microbiology*. 2014;13:42-51.
207. Gooyit M., Janda K.M. Reprofiled anthelmintics bate hypervirulent stationary-phase *Clostridium difficile*. *Scientific Reports*. 2016;6:33642.

BIBLIOGRAFÍA

208. Zabawa T.P., Pucci M.J., Parr T.R. Jr., Lister T. Treatment of Gram-negative bacterial infections by potentiation of antibiotics. *Current Opinion in Microbiology*. 2016;33:7-12.